

KEIMUNGSCHEMMSTOFFE
AUS
SORBUS AUCUPARIA UND THUJA OCCIDENTALIS

ULRIKE OSTER

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554823_0005

KEIMUNGSHEMMSTOFFE

AUS

SORBUS AUCUPARIA UND THUJA OCCIDENTALIS

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereiches Biologie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

Ulrike Oster

aus

Waldkappel

1988

1. Berichterstatter : Prof. Dr. W. Rüdiger
2. Berichterstatter : Prof. Dr. H. Scheer
Tag der mündlichen Prüfung: 29. März 1988

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Wolfhart Rüdiger

am Botanischen Institut der Universität München angefertigt.

Herrn Prof. Rüdiger danke ich herzlich für seine stete Diskussionsbereitschaft und die vielen wertvollen Ratschläge, mit denen er diese Arbeit unterstützte.

Bei Inge Blos möchte ich mich nicht nur für die engagierte Mitarbeit bedanken, sondern auch für die mittlerweile gewachsene Freundschaft, von der ich hoffe, daß sie auch über diese Arbeit hinaus Bestand haben wird.

Herrn Christian Harzer danke ich besonders herzlich für die Durchführung der vielen Aufarbeitungen. Der Kaffee, der jeden Morgen bereit stand, war ganz phantastisch.

Mein Dank gilt auch den Diplomanden, die während dieser Zeit das Labor bevölkerten. Da ist vor allem Adolf Christian Kohlmeyer, mit dem zusammen die vielen Wochenenden im Labor nie langweilig wurden. Des weiteren Martin Spraul, der mit viel Interesse bei der Arbeit war und mit dem man lange Stunden über alle möglichen Themen diskutieren konnte. Als dritter im Bunde ist Joachim Wübert zu nennen, der sich vor allem beim Korrektur lesen besonders ausgezeichnet hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dir, Frank. Du weißt, wir haben schon während der Diplomarbeit zusammen Wunderkerzen angezündet, da bedarf es keiner großen Worte mehr.

Sie alle haben dazu beigetragen, daß in diesem Labor eine Atmosphäre herrschte, in der es Spaß machte, zu arbeiten.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
1. Die Keimung	1
2. Die Keimruhe	2
3. Keimungshemmstoffe	3
II. AUFGABEN - UND PROBLEMSTELLUNG	5
III. MATERIAL UND METHODEN	6
A. Keimungshemmstoffe aus <i>Sorbus aucuparia</i>	6
1. Isolierung von Keimungshemmstoffen aus <i>Sorbus aucuparia</i>	6
1.1 Gewinnung des Rohextraktes	6
1.2 Herstellung von peroxidfreiem Ether	6
1.3 Extraktion mit peroxidfreiem Ether bei pH 8 (Neutralfraktion)	6
1.3.1 Chromatographie der Neutralfraktion an Kieselgel Si 60	7
1.3.2 Destillation der vereinigten Fraktionen mit Keimungshemmung im Hochvakuum bei 70°C	8
1.4 Extraktion mit Ether bei pH 1 (Säurefraktion)	8
1.4.1 Chromatographie der Säurefraktion an Sephadex LH 20	8
1.4.2 Aufreinigung der Säurefraktion I	9
1.4.2.1 Destillation der Säurefraktion I im Hochvakuum bei 70°C (Säurefraktion S I a)	9
1.4.2.2 Destillation der Säurefraktion I im Hochvakuum bei 70°C und 150°C nach Veresterung mit Diazomethan (Säurefraktion S I b und S I c)	10
1.4.2.3 Chromatographie der Säurefraktion S I b an Kieselgel Si 60	10
1.4.3 Aufreinigung der Säurefraktion II	11

	Seite
1.4.3.1 Chromatographie der Säurefraktion II an Kieselgel Si 60	11
1.5 Verseifung mit Ammoniak bei pH 11	12
2. Identifizierung der isolierten Verbindungen aus <i>Sorbus aucuparia</i>	12
2.1 Gaschromatographische Analyse	12
2.2 Gaschromatographie - Massenspektrometrie	13
3. Synthesen der identifizierten Verbindungen aus <i>Sorbus aucuparia</i>	13
3.1 Darstellung der Parasorbinsäure	13
3.2 Darstellung der Isopropyläpfelsäure	14
4. Quantitative Bestimmung der Keimungshemmstoffe aus <i>Sorbus aucuparia</i>	15
4.1 Quantitative Bestimmung der Parasorbinsäure	15
4.1.1 Quantitative Bestimmung der Parasorbinsäure in ganzen Früchten	15
4.1.2 Quantitative Bestimmung der Parasorbinsäure in isolierten Samen	16
4.2 Quantitative Bestimmung der Isopropyläpfelsäure	16
4.3 Quantitative Bestimmung der Abscisinsäure	16
4.3.1 Quantitative Bestimmung der Abscisinsäure in Früchten	16
4.3.2 Quantitative Bestimmung der Abscisinsäure in Samen	17
4.3.3 Quantitative Bestimmung der Abscisinsäure im Fruchtfleisch	17
5. Bestimmung der Aufnahme von exogen zugesetzter Abscisinsäure in <i>Amaranthus caudatus</i> Samen	17
6. Aufarbeitungsschema	18
B. Keimungshemmstoffe aus <i>Thuja occidentalis</i>	19
1. Isolierung von Keimungshemmstoffen aus <i>Thuja occidentalis</i>	19
1.1 Gewinnung des Rohextraktes	19
1.2 Extraktion mit Hexan	19
1.2.1 Chromatographie der Hexan-Phase an Sephadex LH 20	19
1.3 Extraktion mit Methylenchlorid	20
1.3.1 Chromatographie der Methylenchlorid-Phase an Kieselgel Si 60	20

	Seite
1.3.2 Chromatographie der zweiten Hexan-Essigester-Fraktion an Sephadex LH 20	21
1.3.3 Extraktion der Fraktion I mit peroxidfreiem Ether bei pH 8 (Neutralfraktion)	21
1.3.3.1 Destillation der Neutralfraktion im Hochvakuum	21
1.3.3.2 Chromatographie der Neutralfraktion an Kieselgel Si 60	22
1.3.4 Extraktion der Fraktion I mit peroxidfreiem Ether bei pH 1 (Säurefraktion)	22
1.4 Extraktion mit Essigester	23
2. Versuche zur Identifizierung der Keimungshemmstoffe aus Thuja occidentalis	23
2.1 Acetylierung mit Acetylchlorid	23
2.2 Oxidation mit Kaliumpermanganat	24
2.3 Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid	25
2.4 Derivatisierung mit BSTFA	26
2.5 Chromatographie der Säurefraktion an Kieselgel Si 60	27
2.6 Umsetzung von Thujon, Fenchon und Campher mit dest Wasser bei Raumtemperatur	27
3. Darstellung der Thujaketosäure	28
4. Untersuchungen über die Umwandlung der Monoterpene Thujon und Sabinen	28
4.1 Kinetik der Umwandlung von Sabinen zu Terpinen-4-ol	28
4.1.1 Kinetik der Umwandlung von Sabinen zu Terpinen-4-ol in Wasser	28
4.1.2 Kinetik der Umwandlung von Sabinen zu Terpinen-4-ol in Wasser unter Zusatz von Erde	29
4.2 Kinetik der Oxidation von Thujon zu Thujaketosäure unter Zusatz von Wasser	29
5. Untersuchungen über die keimungshemmende Wirkung von Thujon an Amaranthus caudatus	30
6. Aufarbeitungsschema	32

	Seite
C. Untersuchungen von Keimungshemmstoffen und Strukturanalogen an biologischen Testsystemen	33
1. Bestimmung der Keimungshemmung an <i>Amaranthus caudatus</i>	33
1.1 Bestimmung der Keimungshemmung während der Isolierungsschritte	33
1.2 Bestimmung der Keimungshemmung an synthetischen Verbindungen	34
2. Bestimmung der Keimungshemmung an <i>Lepidium sativum</i>	34
2.1 Bestimmung der Keimungshemmung während der Isolierungsschritte	34
2.2 Bestimmung der Keimungshemmung an synthetischen Verbindungen	34
3. Bestimmung der Keimungshemmung an <i>Avena sativa</i>	35
4. Untersuchungen der α -Amylase-Aktivität	35
4.1 Bestimmung der α -Amylase-Aktivität an ganzen Karyopsen von <i>Avena sativa</i>	35
4.2 Bestimmung der α -Amylase-Aktivität embryofreier Karyopsen von <i>Avena sativa</i> mit Gibberellinsäure-Zusatz	36
4.3 Exogener Test auf die Hemmung der α -Amylase-Aktivität	36
IV. ERGEBNISSE	39
A. Keimungshemmstoffe aus <i>Sorbus aucuparia</i>	39
1. Einleitung	39
2. Isolierung von Keimungshemmstoffen aus Vogelbeeren	40
2.1 Extraktion	40
2.1.1 Vergleich der Keimungshemmung des Rohextraktes mit den Etherextrakten an <i>Amaranthus caudatus</i>	41
2.1.2 Vergleich der Keimungshemmung des Rohextraktes mit den Etherextrakten an <i>Lepidium sativum</i>	42
2.1.3 Vergleich der Keimungshemmung der Etherextrakte an <i>Amaranthus caudatus</i> mit <i>Lepidium sativum</i>	43
2.2 Aufarbeitung der Neutralfraktion	44

	Seite
2.2.1 Vergleich der Keimungshemmung der nicht aufgereinigten Neutralfraktion mit Parasorbinsäure an <i>Amaranthus caudatus</i> und <i>Lepidium sativum</i>	46
2.3 Aufarbeitung der Säurefraktion	47
2.3.1 Chromatographie der Säurefraktion an Sephadex LH 20	47
2.3.2 Aufarbeitung der Säurefraktion I	49
2.3.2.1 Destillation im Hochvakuum	50
2.3.2.2 Chromatographie der Säurefraktion I b an Kieselgel Si 60	52
2.3.3 Aufarbeitung der Säurefraktion II	53
2.3.3.1 Chromatographie an Kieselgel Si 60	55
3. Quantitative Bestimmung der Keimungshemmstoffe aus <i>Sorbus aucuparia</i>	57
3.1 Bestimmung der Parasorbinsäure in Früchten und Samen	57
3.2 Bestimmung der Isopropyläpfelsäure	58
3.3 Bestimmung der Abscisinsäure in Früchten, Fruchtfleisch und Samen	58
4. Vergleich des Gehaltes von Parasorbinsäure und Abscisinsäure im Samen von <i>Sorbus aucuparia</i> mit den exogen benötigten Mengen bei <i>Amaranthus caudatus</i> , <i>Lepidium sativum</i> und <i>Avena sativa</i>	59
5. Untersuchungen über die Aufnahme von exogen zugesetzter Abscisinsäure bei <i>Amaranthus caudatus</i>	60
6. Diskussion der Ergebnisse	61
6.1 Isolierung von Keimungshemmstoffen aus <i>Sorbus aucuparia</i>	61
6.2 Isolierte Keimungshemmstoffe aus <i>Sorbus aucuparia</i>	62
6.2.1 Isopropyläpfelsäure	62
6.2.2 Parasorbinsäure	63
6.2.3 Abscisinsäure	64
B. Keimungshemmstoffe aus <i>Thuja occidentalis</i>	66
1. Einleitung	66



	Seite
2. Isolierung von Keimungshemmstoffen aus <i>Thuja occidentalis</i>	68
2.1 Extraktion	68
2.1.1 Vergleich der Keimungshemmung an <i>Amaranthus caudatus</i>	68
2.1.2 Vergleich der Keimungshemmung an <i>Lepidium sativum</i>	69
2.1.3 Vergleich der Keimungshemmung an <i>Amaranthus caudatus</i> und <i>Lepidium sativum</i>	70
2.2 Aufarbeitung der Hexan-Phase	72
2.3 Aufarbeitung der Methylenchlorid-Phase	73
2.3.1 Chromatographie an Kieselgel Si 60	73
2.3.1.1 Vergleich der Keimungshemmung der einzelnen Fraktionen an <i>Amaranthus caudatus</i> mit der Methylenchlorid-Phase	74
2.3.1.2 Vergleich der Keimungshemmung der einzelnen Fraktionen an <i>Lepidium sativum</i> mit der Methylenchlorid-Phase	75
2.3.1.3 Vergleich der Keimungshemmung an <i>Amaranthus caudatus</i> und <i>Lepidium sativum</i>	76
2.3.2 Chromatographie der Hexan-Essigester-Fraktion an Sephadex LH 20	77
2.3.2.1 Vergleich der Keimungshemmung an <i>Amaranthus caudatus</i> der Fraktionen I und II mit der Hexan-Essigester-Fraktion	78
2.4 Extraktion der Fraktion I mit Ether bei pH 8 und pH 1	79
2.5 Versuche zur weiteren Aufreinigung der Neutralfraktion	83
2.5.1 Vergleich der Keimungshemmung vor und nach Entfernen der Monoterpene Fenchon, Thujon und Campher	83
2.5.2 Destillation der Neutralfraktion im Hochvakuum	85
2.5.3 Chromatographie der Neutralfraktion an Kieselgel Si 60	87
2.6 Extraktion der Fraktion II mit Ether bei pH 8 und pH 1	89
2.7 Isolierung von Abscisisäure mittels Heißextraktion	90
3. Versuche zur Identifizierung der Keimungshemmstoffe aus <i>Thuja occidentalis</i>	91
3.1 Versuche zur Identifizierung der Verbindung der Neutralfraktion	91
3.1.1 Acetylierung mit Acetylchlorid	91

	Seite
3.1.2 Oxidation mit Kaliumpermanganat	92
3.1.3 Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid	93
3.1.4 Derivatisierung mit BSTFA	93
3.2 Versuche zur Identifizierung der Säurefraktion	94
3.2.1 Derivatisierung mit BSTFA	94
3.2.2 Acetylierung mit Acetylchlorid	96
3.2.3 Chromatographie der Säurefraktion an Kieselgel Si 60	96
3.2.4 Umsetzung von Thujon, Fenchon und Campher in Wasser	97
4. Untersuchungen über die Umwandlung der Monoterpene Thujon und Sabinen	99
4.1 Kinetik der Umwandlung von Sabinen zu Terpinen-4-ol in Wasser ohne und mit Zusatz von Erde	100
4.2 Kinetik der Oxidation von Thujon zu Thujaketosäure	102
5. Untersuchungen über die keimungshemmende Wirkung von Thujon	104
6. Diskussion der Ergebnisse	107
6.1 Isolierung von Keimungshemmstoffen aus Thuja occidentalis	107
6.2 Isolierte Keimungshemmstoffe aus Thuja occidentalis	108
6.2.1 Isolierte Verbindung 5 der Neutralfraktion	108
6.2.2 Thujaketosäure	109
6.2.3 Monoterpene	109
6.3 Keimungshemmende Wirkung der Thuja occidentalis Pflanze auf die Umgebung	112
C. Massenspektrometrie	114
1. Einleitung	114
2. Massenspektren der isolierten Keimungshemmstoffe aus Sorbus aucuparia	116
2.1 Massenspektren der Parasorbinsäure	116
2.2 Massenspektren des Isopropyläpfelsäuredimethylesters	119

	Seite
3. Massenspektroskopische Untersuchungen der isolierten Keimungs- hemmstoffe aus <i>Thuja occidentalis</i>	120
3.1 Massenspektrum der isolierten Verbindung 5 der Neutral- fraktion	120
3.1.1 Massenspektrum der isolierten Verbindung 5 nach Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid	122
3.2 Massenspektren der isolierten Verbindungen der Säurefraktion nach Umsetzung mit Diazomethan	123
3.2.1 Massenspektren der isolierten Verbindungen der Säurefraktion nach Derivatisierung mit BSTFA	126
3.2.2 Massenspektren des synthetischen cis- und trans-Thujaketosäure- methylesters	128
4. Diskussion der Ergebnisse	130
 D. Untersuchungen von Keimungshemmstoffen und Strukturanalogen an biologischen Testsystemen	 134
1. Einleitung	134
2. Vergleich der Keimungshemmung an <i>Amaranthus caudatus</i> , <i>Lepidium sativum</i> und <i>Avena sativa</i>	137
2.1 Parasorbinsäure und Strukturanaloge	138
2.2 Isopropyläpfelsäuredimethylester und Strukturanaloge	145
2.3 Thujaketosäure und Strukturanaloge	150
2.4 Monoterpene	154
2.5 Vergleich der Keimungshemmung von Abscisinsäure mit Struktur- analogen der isolierten Keimungshemmstoffe	159
3. Untersuchungen der α -Amylase-Aktivität	161
3.1 Bestimmung der α -Amylase-Aktivität an ganzen Karyopsen von <i>Avena sativa</i>	161
3.1.1 Parasorbinsäure und Strukturanaloge	161
3.1.2 Isopropyläpfelsäuredimethylester und Strukturanaloge	164

	Seite
3.1.3 Thujaketosäure und Strukturanaloge	167
3.1.4 Monoterpene	169
3.2 Bestimmung der α -Amylase-Aktivität embryofreier Karyopsen von Avena sativa mit Gibberellinsäure-Zusatz	172
3.3 Exogener Test auf die Hemmung der α -Amylase-Aktivität	177
4. Diskussion der Ergebnisse	179
 V. ZUSAMMENFASSUNG	 185
 VI. LITERATURVERZEICHNIS	 189

Tabellenanhang

I. EINLEITUNG

1. Die Keimung

Am Beginn der Entwicklung einer höheren Pflanze steht die Keimung des Samens. Sie läßt sich in drei Stadien unterteilen (Simon, 1984).

Die erste, passive Phase beginnt mit der Aufnahme von Wasser in die Samen. Ein trockener Samen enthält ungefähr 15% Wasser, das auf 30 bis 50% gesteigert wird. Dieser Vorgang kann je nach Samenmaterial 2,5 Stunden bis zwei Tage dauern (Waggoner und Parlange, 1976; Wübert, pers. Mitteilung). Während dieser Zeit werden Gase (möglicherweise Luft) freigesetzt (Parrish und Leopold, 1977), und die Atmung beginnt (Mayer und Shain, 1974).

Der Samen tritt im Anschluß daran in die Lag-Phase, bei der äußerlich keine Veränderungen festzustellen sind. Während dieser Zeit werden die Membranen entweder reorganisiert (Wunderlich et al., 1978) oder, wie z.B. bei der Sojabohne, Proteine in die Membranen eingelagert (Chabot und Leopold, 1982). Proteine, die in den trockenen Samen vorhanden sind, werden durch Konformationsänderung aktiviert und weitere für die Keimung notwendige Proteine synthetisiert (Dasgupta und Bewley, 1982). Zu Beginn dieser Phase wird mRNA gebildet (Huang et al., 1980). Die DNA-Synthese, gefolgt von der Zellteilung, setzt erst nach 24 Stunden und später ein (Simon, 1984).

Im dritten Stadium werden Veränderungen am Samen sichtbar. Abgeschlossen wird diese Phase mit dem Austritt der Keimwurzel (Esashi und Leopold, 1968).

Die benötigte Energie für die oben aufgeführten Umsetzungen wird durch den Abbau der Reservestoffe in den Samen gewonnen.

Die meisten Samen enthalten Fette als Reservestoff. Sie werden in speziellen Organellen (Spherosomen) gespeichert, die die Enzyme der Fettsäure-Biosynthese und des Abbaus besitzen. Diese Organellen werden zu einem späten Zeitpunkt der Keimung aufgelöst (Mayer und Marbach, 1981). Ein

weiteres Organell, welches für die Metabolisierung der Fette benötigt wird, sind die Glyoxysomen. Die Glyoxysomen sind ein Beispiel für ein Organell, welches speziell während der Keimung gebildet und im Anschluß aufgelöst wird.

Als weiterer Reservestoff können Proteine in den Samen enthalten sein. In den Mung-Bohnen sind sie in Proteinkörpern abgelagert, die gleichzeitig die proteolytischen Enzyme beinhalten (Harris und Chrispeels, 1975). Die Proteinkörper werden während der Keimung aufgelöst (Shutov und Vaintraub, 1987).

Der dritte wichtige Speicherstoff ist die Stärke. Alle Getreidearten besitzen Stärke als Hauptreservestoff. Sie ist in Granula im Samen angeordnet. Der Abbau der Stärke während der Keimung wird seit vielen Jahren untersucht. Die α -Amylase, die die Stärke im Samen hydrolysiert, ist ein Beispiel für ein Enzym, welches während der Keimung in der Aleuronschicht neu synthetisiert wird. Diese Synthese wird induziert durch Gibberelline, die im Embryo teils vorhanden und teils mit Beginn der Wasseraufnahme im Samen synthetisiert werden (Ashford und Gubler, 1984). Der Mechanismus der Induktion der α -Amylase-Bildung ist bis heute nicht geklärt.

Die Keimung ist also ein Vorgang, bei dem viele Stoffwechselvorgänge, hydrolytischer und auch synthetischer Art, gleichzeitig nebeneinander ablaufen. Diese Stoffwechselaktivitäten können aber auch durch verschiedene Faktoren unterbunden sein. Nicht jeder Samen kann sofort im Anschluß an seine Entwicklung zum Auskeimen gelangen.

2. Die Keimruhe

Als Keimruhe bezeichnet man den Zeitraum, während dem ein Samen trotz optimaler Bedingungen hinsichtlich der Temperatur, Feuchtigkeit und Sauerstoff nicht zum Auskeimen gelangen kann (Tran und Cavanagh, 1984; Taylorson und Hendricks, 1977). Viele Samen durchlaufen zunächst diesen Zustand der Keimruhe, der unterschiedliche Ursachen haben kann.

Bei manchen Samen ist zum Zeitpunkt der Abtrennung von der Pflanze der Embryo nicht vollständig ausgewachsen. Während der Keimruhe wächst der

Embryo und erreicht danach erst seine Keimfähigkeit (Villiers und Wareing , 1964) .

Ist die Samenschale für Wasser undurchlässig , führt dies ebenfalls zu einer Keimruhe der Samen .

Keimruhe kann aber auch durch Substanzen erzeugt werden , die auf physiologische Vorgänge der Keimung Einfluß nehmen können . Sie werden allgemein als Keimungshemmstoffe bezeichnet .

3. Keimungshemmstoffe

Das wohl bekannteste Beispiel für einen Keimungshemmstoff ist die Abscisisäure . Samen verschiedener Species akkumulieren Abscisisäure in den Samen während ihrer Entwicklung (King , 1976 ; Eeuwens und Schwabe , 1975) . Frisch geerntete Samen enthalten meist einen höheren Gehalt an Abscisisäure als solche , die längere Zeit gelagert sind (Ross , 1984) . Bei Haselnüssen sind 97,5% des gesamten Gehaltes an Abscisisäure im Perikarp angereichert . Das Entfernen dieser Schale führte zu einer 62% igen Keimung der Samen (Williams et al. , 1973) . Keimungshemmstoffe üben also einen Einfluß auf die Keimung der Samen aus .

Keimungshemmstoffe werden seit vielen Jahren aus Pflanzen isoliert und auf ihre Wirkungen untersucht (Ketring , 1973) . Hinsichtlich der Auswahl des Pflanzenmaterials geht man dabei von zwei Standpunkten aus . Entweder werden Samenmaterialien , die eine ausgeprägte Keimruhe besitzen (Webb und Wareing , 1972) , oder es werden Pflanzenteile wie Blätter , Wurzeln , Stiele und Samen auf Keimungshemmstoffe untersucht (Bhandari und Sen , 1971 ; Muller et al. , 1964 ; Junttila , 1976) , die andere Pflanzen in der Nachbarschaft beeinflussen können . Im letzteren Fall handelt sich um den Bereich der allelopathischen Wirkungen . Bei vielen Wüstenpflanzen z.B. beobachtet man allelopathische Wirkungen (Friedman , 1987) . Ein anderes Beispiel ist die Wermut - Pflanze , die das Auskeimen von Fenchel - Samen in Abhängigkeit der Entfernung beeinflusst (Bode , 1940) . Die Abgabe allelopathisch wirkender Stoffe dient dem Überleben der Pflanze .

Bei den isolierten Keimungshemmstoffen, ob unter dem Gesichtspunkt der ausgeprägten Keimruhe oder allelopathischer Effekte, handelt es sich strukturell um gleiche Verbindungsklassen. Es sind Moleküle mit niedrigem Molekulargewicht, die zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen zu zählen sind. Einige typische Substanzklassen sind:

1. Fettsäuren werden aus den verschiedensten Pflanzenmaterialien isoliert. Diese Säuren können verzweigt (Isogai et al., 1984), oxidiert (Nakatani et al., 1986) und Fettsäuren mit einer Kettenlänge von acht C- bis 22 C-Atomen sein (Tsuzuki et al., 1987).
2. Eine weitere wichtige Substanzklasse bilden die phenolischen Carbonsäuren. Zu ihnen gehören auch Derivate der Zimtsäure, die aus vielen Pflanzen isoliert werden (Karl, 1979; Groß, 1980). Einhellig et al (1982) konnten an *Sorghum* synergistische Effekte der Zimtsäure, Kaffeesäure, p-Cumarsäure und der Ferulasäure nachweisen.
3. Die Cumarine leiten sich strukturell von der Zimtsäure ab. Wichtige isolierte Derivate sind das Isofraxidin und das Psoralen. Psoralen hemmt die Keimung und das Wurzelwachstum von Tomate, Gurke und Salat (Groß, 1980).
4. Des weiteren werden die flüchtigen Monoterpene in vielen Fällen mit allelopathischen Wirkungen einzelner Pflanzenarten in Verbindung gebracht (Rice, 1984).

Strukturell unterscheiden sich diese Substanzklassen sehr stark. Es ist deshalb zu erwarten, daß sie bei der Keimung bei verschiedenen Stoffwechselvorgängen eingreifen. Untersuchungen über den Wirkmechanismus dieser Verbindungen beziehen sich im wesentlichen auf mögliche antagonistische Wirkungen im Zusammenhang mit Wachstumsregulatoren (Webb und Wareing, 1972; Hogetsu et al., 1974).

Keimungshemmstoffe wirken im allgemeinen nicht artspezifisch. Sie hemmen die Keimung unterschiedlicher Pflanzenarten. Da die Keimungshemmstoffe in der Lage sind, die Keimung entweder endogen zu verhindern oder zu verzögern, sowie die Keimung artfremder Samen zu verhindern, besitzen sie eine große biologische Bedeutung.

II. AUFGABEN - UND PROBLEMSTELLUNG

1. Die Keimungshemmstoffe aus *Sorbus aucuparia* sollten isoliert und identifiziert werden. Durch quantitative Bestimmungen der identifizierten Keimungshemmstoffe sollte abgeschätzt werden, welchen Beitrag die einzelnen Keimungshemmstoffe zur Keimruhe der Samen von *Sorbus aucuparia* leisten.
2. Als weiterführende Arbeit von Lohaus (1985), die ein Isomergemisch von Keimungshemmstoffen aus *Thuja occidentalis* isoliert hatte, sollte eine neue Aufarbeitungsmethode unter Vermeidung von Isomerisierungen ausgearbeitet und die Struktur der isolierten Verbindung aufgeklärt werden.
3. Da *Thuja occidentalis* flüchtige Monoterpene enthält, die allgemein als allelopathisch wirkende Substanzen beschrieben sind, sollte im Modell untersucht werden, auf welche Weise deren Wirkung auf Samen in der Umgebung von *Thuja occidentalis* erfolgen kann. Des weiteren sollte der keimungshemmende Anteil der Monoterpene im Vergleich zu den anderen isolierten Keimungshemmstoffen in *Thuja occidentalis* abgeschätzt werden.
4. Die isolierten und identifizierten Keimungshemmstoffe aus *Sorbus aucuparia* und *Thuja occidentalis* sollten im Vergleich zu Strukturanalogen auf ihre Struktur - Wirkungsbeziehungen an *Amaranthus caudatus*, *Lepidium sativum* und *Avena sativa* untersucht werden.
5. Als ein Beispiel für die Wirkung der isolierten Keimungshemmstoffe und Strukturanalogen auf den Abbau eines Reservestoffes sollte die Hemmung der α -Amylase-Aktivität untersucht werden.

MATERIAL UND METHODEN

A. Keimungshemmstoffe aus *Sorbus aucuparia*

1. Isolierung von Keimungshemmstoffen aus *Sorbus aucuparia*

1.1 Gewinnung des Rohextraktes

500 g Vogelbeeren werden unter Zusatz von etwas Wasser (bidest) im Mixer zerkleinert . Anschließend wird der dickflüssige Brei mit Wasser (bidest) in einen 5 l Rundkolben gespült . Nach Zugabe von insgesamt 2,5 l Wasser wird für 24 Std. unter Rückfluß gekocht . Der erkaltete, orangerote Extrakt wird filtriert und das Volumen bestimmt . Das Filtrat (2600 ml) wird auf Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* untersucht (siehe III.C.1.1 , III.C.2.1 und IV.A.2.1) .

1.2 Herstellung von peroxidfreiem Ether

Der zur Extraktion des Pflanzenmaterials verwendete peroxidfreie Ether wird nach der Methode von Larsen (1955) gewonnen . Hierzu wird 1 l technischer Ether mit 0,5 g fein zerstoßenem Calciumoxid und 2,5 g Eisen - II - sulfat in 25 ml dest. Wasser drei Minuten lang kräftig geschüttelt , dann die grau bis graugrüne (bei starker Verunreinigung braune) wässrige Phase verworfen . Nach insgesamt dreimaligem Ausschütteln wird der Ether destilliert , wobei der Vorlauf 50 ml umfaßt und die letzten 100 ml verworfen werden . Wasserfreier Ether wird durch Trocknen über Calciumchlorid hergestellt .

1.3 Extraktion mit peroxidfreiem Ether bei pH 8 (Neutralfraktion)

Der nach 1.1 gewonnene Rohextrakt wird mit Ammoniak auf pH 8 eingestellt (Farbumschlag von orangerot nach violett) und im Perforator mit dem nach 1.2 gewonnenen Ether 48 Stunden extrahiert . Die Etherphase wird am Rota-

tionsverdampfer auf ca 500 ml eingeengt und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Nach ca 2 Stunden Trocknung wird filtriert, der restliche Ether am Rotationsverdampfer abgezogen und die Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* bestimmt (siehe III.C.1.1, III.C.2.1 und IV.A.2.1).

1.3.1 Chromatographie der Neutralfraktion an Kieselgel Si 60

Kieselgel Si 60 (Fa Merck Nr 15111) wird zur Trocknung ungefähr vier Stunden bei 110°C im Trockenschrank ausgeheizt und anschließend im Exsikkator über Calciumchlorid auf Raumtemperatur abgekühlt. Danach wird das Kieselgel mit Hexan zu einem dickflüssigen Brei vermischt. Dieser wird in eine unten mit Watte verschlossene Säule (Durchmesser 2,3 cm ; Länge 22 cm) gefüllt. Nun spült man die Säule vier Stunden mit Hexan. Auf die so vorbereitete Säule werden 2 ml der nach III.A.1.3 gewonnenen Neutralfraktion (gelbliches Öl) aufgetragen und mit folgendem Stufengradienten eluiert :

1. 100 ml Hexan
2. 100 ml Hexan-Essigester 95 : 5
3. 100 ml Hexan-Essigester 90 : 10
4. 100 ml Hexan-Essigester 80 : 20
5. 100 ml Hexan-Essigester 50 : 50
6. 100 ml Hexan-Essigester 25 : 75
7. 200 ml Methanol

Die erhaltenen Fraktionen werden eingeengt, in 10 ml Aceton aufgenommen und auf Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* untersucht (siehe III.C.1.1). Die Fraktionen 5 und 6 zeigen Keimungshemmung und werden zur weiteren Aufreinigung vereinigt.

1.3.2 Destillation der vereinigten Fraktionen mit Keimungshemmung im Hochvakuum bei 70°C

Die vereinigten Fraktionen der Kieselgeltrennung werden mit Ether quantitativ in einen 10 ml Spitzkolben überführt. Danach entfernt man den Ether wieder und destilliert den Rückstand im Hochvakuum (Ölpumpe 0,5 Torr) bei 70°C (Luftbad). Die Vorlage wird mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Nach einer Stunde wird die Destillation abgebrochen. Das Destillat, eine farblose, stechend riechende Flüssigkeit (ungefähr 1-2 ml), wird auf Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* untersucht (siehe III.C.1.1). Anschließend wird eine gaschromatographische und massenspektroskopische Analyse durchgeführt (siehe III.A.2.1 , III.A.2.2 , IV.A.2.2 und IV.C.2.1).

1.4 Extraktion mit Ether bei pH 1 (Säurefraktion)

Den wässrigen Rückstand der Extraktion bei pH 8 (siehe III.A.1.3) stellt man mit Schwefelsäure auf pH 1 ein, wobei ein Farbwechsel von violett nach orangerot zu beobachten ist. Anschließend wird im Perforator mit dem nach III.A.1.2 hergestellten Ether für 48 Stunden extrahiert. Nach Einengen der Etherphase auf ungefähr 500ml wird mit Natriumsulfat 2 Stunden lang getrocknet. Die Etherphase wird filtriert und der Ether am Rotationsverdampfer entfernt. Es wird ein Keimungshemmtest an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* durchgeführt (siehe III.C.1.1, III.C.2.1 , IV.A.2.1).

1.4.1 Chromatographie der Säurefraktion an Sephadex LH 20

Sephadex LH 20 wird mit der vierfachen Menge an bidestilliertem Wasser versetzt und über Nacht vorgequollen. Nach Entgasen im Wasserstrahlvakuum wird das Gel in eine mit Watte verschlossene Säule (Durchmesser 4,8 cm ; Länge 40 cm) gefüllt. Es ist darauf zu achten, daß die Säule senkrecht angebracht wird, damit sich eine gleichmäßige und reproduzierbare Oberfläche bildet. Nun wird mit bidest Wasser über Nacht äquilibriert, wobei die Säule

nicht trockenlaufen darf , damit keine Risse im Gel entstehen , die die Trennleistung beeinflussen können . Die Säurefraktion wird in 8ml Methanol gelöst und auf die Säule aufgetragen . Es wird eluiert mit folgendem Stufengradienten :

1. 2 Säulenvolumina Wasser (bidest)
2. 2 Säulenvolumina Wasser (bidest) - Methanol 1 : 1
3. 2 Säulenvolumina Methanol

Die Detektion erfolgt mit einem Durchflußspektrometer (Fa Gilson Spectrom M) bei 254 nm . Die Fraktionen werden mit einem Fraktionssammler (Fa Gilson mini MTDC) gesammelt . Die Aufzeichnung erfolgt auf einem Schreiber der Fa Abimed . Von jeder fünften Fraktion wird ein Keimungshemmtest an *Amaranthus caudatus* (250 µl der Fraktionen) und *Lepidium sativum* (375 µl der Fraktionen) durchgeführt (siehe III.C.1.1 , III.C.2.1 und IV.A.2.3.1) .

1.4.2 Aufreinigung der Säurefraktion I

Die Fraktionen 30-50 (Säurefraktion I) der Chromatographie an Sephadex LH 20 werden vereinigt , das Volumen bestimmt und ein Keimungshemmtest an *Amaranthus caudatus* . durchgeführt . Anschließend fügt man einen Tropfen verd. Schwefelsäure hinzu , um den Ansatz auf pH 1 zu bringen und schüttelt dreimal mit peroxidfreiem Ether aus (die Gefriertrocknung erwies sich an dieser Stelle als ungünstig , da Verluste an Keimungshemmung auftraten siehe IV.A.2.3.2) . Die Etherphase wird über Natriumsulfat getrocknet und danach eingeengt . Nun wird die Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* bestimmt .

1.4.2.1 Destillation der Säurefraktion I im Hochvakuum bei 70°C (Säurefraktion SIa)

Vier Aufarbeitungen werden auf dieser Stufe vereinigt , mit Ether quantitativ in einen 10 ml Spitzkolben überführt und im Ölpumpenvakuum (0,5 Torr) bei 70°C (Luftbad) für eine Stunde destilliert . Die Vorlage wird mit flüssigem Stickstoff gekühlt . Dabei gehen Spuren einer farblosen , stechend riechenden

Flüssigkeit über. Die Apparatur wird mit Ether quantitativ ausgewaschen, der Ether abgezogen und ein Keimungshemmtest an *Amaranthus caudatus* durchgeführt (siehe IV.A.2.3.2.1 und III.C.1.1).

1.4.2.2 Destillation der Säurefraktion I im Hochvakuum bei 70°C und 150°C nach Veresterung mit Diazomethan (Säurefraktion S I b und S I c)

In einen 50 ml Dreihalskolben mit Tropftrichter, Vorstoß und absteigendem Kühler gibt man eine Lösung von 3 g Kaliumhydroxid in 5 ml dest. Wasser, 17 ml "Carbitol" (Diethylen glykolmonoethylether) und 5 ml Ether. Man erhitzt diese Mischung im Wasserbad auf 70–75°C. Sobald der Ether zu sieden beginnt, tropft man eine Lösung von 10 g N-Methyl-N-Nitroso-p-Toluolsulfonamid in ca. 80 ml Ether innerhalb einer 1/4 Stunde zu. Während der Destillation muß die Mischung im Destillationskolben gerührt und die Vorlage gut gekühlt werden. Das Diazomethan wird vor Benutzung auf -20°C abgekühlt, um das enthaltene Wasser auszufrieren.

Der Rückstand der Destillation im Hochvakuum bei 70°C (siehe III.A.1.4.2.1) wird mit Diazomethan versetzt, wobei eine starke Gasentwicklung einsetzt. – Es wird solange Diazomethan hinzugegeben, bis die gelbe Farbe des Diazomethans erhalten bleibt. Nun läßt man den Ansatz 1/4 Stunde bei Raumtemperatur stehen. Danach zieht man das überschüssige Diazomethan am Rotationsverdampfer ab und destilliert im Hochvakuum (0,5 Torr) bei 70°C (Luftbad) und anschließend bei 150°C für jeweils eine Stunde. Die beiden Fraktionen, wie auch der Rückstand, werden auf Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* untersucht (siehe III.C.1.1 und IV.A.2.3.2.1).

1.4.2.3 Chromatographie der Säurefraktion S I b an Kieselgel Si 60

Das Kieselgel wird vorbereitet wie unter III.A.1.3.1 beschrieben, danach wird es jedoch in Hexan-Ether 55:45 aufgeschlämmt und in eine unten mit Watte verschlossene Pasteurpipette gegeben. Nun spült man die Säule eine Stunde mit einer Hexan-Ether-Mischung derselben Polarität (der Ether muß

wasserfrei sein und wird deshalb über Calciumchlorid vorher getrocknet). Auf die so vorbereitete Säule wird 1/50 des unter III.A.1.4.2.2 gewonnenen Materials (5 µl) aufgetragen. Um eine gleichmäßigere Verteilung auf der Oberfläche der Säule zu erreichen, werden die 5 µl vorher mit 45 µl Ether verdünnt. Nun wird mit folgenden Polaritätsmischungen eluiert:

1. 2 ml Hexan-Ether 45 : 55
2. 6 ml Hexan-Ether 50 : 50
3. 5 ml Ether

Die Mischung Hexan-Ether 50 : 50 wird in 12 Fraktionen unterteilt (1 ml; 1 ml; 0,5 ml; 5 x 0,2 ml; 3 x 0,5 ml; 1ml). Die Fraktionen werden gaschromatographisch untersucht. Mehrere dieser Trennungen werden durchgeführt, die Fraktionen mit gleicher Zusammensetzung vereinigt und die Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* bestimmt (siehe IV.A.2.3.2.2).

1.4.3 Aufreinigung der Säurefraktion II

Die Fraktionen 110 - 130 (Säurefraktion II) der Chromatographie an Sephadex LH 20 werden vereinigt, das Volumen und die Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* bestimmt. Nun wird das Wasser durch Gefriertrocknen entfernt. Der Rückstand wird mit Diazomethan (Darstellung siehe III.A.1.4.2.2) verestert und die Keimungshemmung erneut ermittelt (siehe III.C.1.1 ; III.C.2.1 und IV.A.2.3.3). Es wird eine Dünnschichtchromatographie im Vergleich zu Abscisinsäuremethylester durchgeführt. Dünnschichtplatten Fa Merck Nr. 5729 mit Fluoreszenzindikator. Fließmittel Hexan-Essigester 15 : 85.

1.4.3.1 Chromatographie der Säurefraktion II an Kieselgel Si 60

Das Kieselgel wurde vorbereitet wie unter III.A.1.3.1 beschrieben. Die Aufschlammung wird mit Hexan-Essigester 50 : 50 durchgeführt. Als Säule wird eine mit Watte verschlossene Pasteurpipette genommen. Nachdem man eine Stunde mit Hexan-Essigester gespült hat, wird die Gesamtmenge einer

Präparation , gelöst in 100µl Aceton , aufgetragen . Es wird mit einem Stufen-
gradienten folgender Polarität eluiert :

1. 1 ml Hexan-Essigester 50 : 50
2. 1 ml Hexan-Essigester 45 : 55
3. 1 ml Hexan-Essigester 40 : 60
4. 1 ml Hexan-Essigester 25 : 75
5. 1 ml Hexan-Essigester 15 : 85
6. 1 ml Essigester
7. 1 ml Essigester-Aceton 50 : 50
8. 1 ml Aceton
9. 1 ml Aceton-Methanol 50 : 50
10. 1 ml Methanol

Die Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* wird
bestimmt . Die Fraktionen werden dünn- und gaschromatographisch
untersucht (siehe III.A.1.4.3 , IV.A.2.3.3 und IV.A.2.3.3.1).

1.5 Verseifung mit Ammoniak bei pH 11

Der wässrige Rückstand der Extraktion mit Ether bei pH 1 (siehe III.A.1.4)
wird mit conc Ammoniak auf pH 11 eingestellt und 24 Stunden bei Raumtem-
peratur gerührt . Danach bringt man den Extrakt mit halbkonzentrierter
Schwefelsäure auf pH 1 und extrahiert mit peroxidfreiem Ether für 48 Stun-
den . Nach Einengen der Etherphase auf ca 500 ml wird über Natriumsulfat
getrocknet . Anschließend filtriert man und zieht den Ether am Rotationsver-
dampfer ab . Die Keimungshemmung wird an *Amaranthus caudatus* und
Lepidium sativum bestimmt (siehe IV.A.2.1).

2. Identifizierung der isolierten Verbindungen aus *Sorbus aucuparia*

2.1 Gaschromatographische Analyse

Die aufgereinigten Fraktionen mit Keimungshemmung werden gaschromato-

graphisch auf Reinheit und quantitativen Gehalt untersucht.

Gerät : Carlo Erba Mod. 4130
Säule : Quarzkapillare SE 54 (Länge 20 m)
Detektor : Flammenionisation (FID)
Trärgas : Helium (flowrate : $2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$)
Injektortemperatur : 240°C
Injektion : splitlos , auf die kalte Säule bei ca 3 bar
Temperaturprogramm : $50^\circ\text{C} - 250^\circ\text{C}$ mit $5^\circ\text{C} / \text{min}$

2.2 Gaschromatographie - Massenspektroskopie

Gerät : Finnigan MAT 4500
Gaschromatograph
Säule : Quarzkapillare SE 54 (Länge 30 m)
Detektor : Totalionenstrom (TIC)
Trärgas : Helium (flowrate $2 \text{ cm}^3 / \text{min}$)
Injektortemperatur : 240°C
Injektion : splitlos , auf die kalte Säule
Temperaturprogramm : $50^\circ\text{C} - 250^\circ\text{C}$ mit $5^\circ\text{C} / \text{min}$
Massenspektrometer
Massenbereich : 33 m/z bis (je nach Molekulargewicht) 200,250
oder 300 m/z)
Ionisierungsenergie : 70 eV
Ionisierungstemperatur : 120°C
Multiplierspannung : - 1200 KV

3. Synthesen der identifizierten Verbindungen aus Sorbus aucuparia

3.1 Darstellung der Parasorbinsäure

Die Darstellung erfolgt in Anlehnung an die Synthese von Kuhn und Jerchel

(1943). In einen Zweihalskolben, der mit Rückflußkühler und Trockenrohr versehen ist, werden 5 g Sorbinsäure und 100 ml 47% ige Bromwasserstoffsäure gegeben. Unter Umrühren leitet man für 40 min Bromwasserstoff ein, bis die Sorbinsäure gelöst ist. Es wird für weitere 4 Stunden gerührt. Die Lösung verfärbt sich langsam braun. Nach Stehenlassen über Nacht bei Raumtemperatur entsteht ein weißer Niederschlag. Die weißlichen Kristalle werden abfiltriert und mit 100 ml Wasser unter Rückfluß etwa 2 Stunden gekocht. Zunächst bildet sich ein Öl, das sich nach und nach löst. Nach dem Erkalten wird die Lösung mit Ammoniumsulfat gesättigt und dreimal mit Ether ausgeschüttelt. Anschließend wäscht man die Etherphase mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat - Lösung und mit Wasser. Die Etherphase wird getrocknet über Natriumsulfat und der Ether anschließend abgezogen. Nun destilliert man im Hochvakuum bei 70°C.

Ausbeute : 0,9 g = 18% d. Th

Literatur : 29% d. Th

IR : 3600 - 3500; 2990 - 2940; 1700; 1380; 1250; 1160; 1100;
1040; 980; 940 [cm⁻¹]

3.2 Darstellung der Isopropyläpfelsäure

Die Darstellung erfolgt in Anlehnung an Yamashita (1958). In einen Zweihalskolben, der mit einem Rückflußkühler (oben wird ein Schlauch angeschlossen, der in eine KOH - Lösung taucht) versehen ist, werden 5 g Ethyl - isobutyrylacetat und 3,3 g Kaliumcyanid gegeben. Die Mischung wird auf 0°C abgekühlt und unter Rühren tropfenweise 5,6 ml conc Salzsäure hinzugefügt. Nach 2 Stunden rühren bei 0°C wird die Mischung dreimal mit Ether extrahiert. Der Ether wird abgezogen, zu dem Öl (ca 3 ml) gibt man ca 6 ml conc Salzsäure und rührt für 48 Stunden bei Raumtemperatur. Danach wird der Ansatz mit 50 ml Wasser verdünnt und in einem 100 ml Perforator für 48 Stunden mit Ether extrahiert. Der Ether wird abgezogen, 20 ml 1 N Salzsäure hinzugegeben. Nun kocht man für 3 Stunden unter Rückfluß. Nach Einengen zur Trockene am Rotationsverdampfer extrahiert man den Rückstand mehr-

mals mit Essigester. Die Essigester-Phase wird eingengt und tropfenweise Hexan hinzugegeben, bis eine Trübung auftritt. Der Ansatz wird zum Auskristallisieren bei 4°C aufbewahrt. Es entsteht ein weißes Pulver, das erneut aus Hexan-Essigester umkristallisiert wird. Nach dem zweiten Umkristallisieren bilden sich weiße, blattartige Kristalle.

Ausbeute : 1,4 g = 24% d. Th
Literatur : 28% d. Th
IR : 3400-3010; 2990; 1750; 1420; 1395; 1270; 1230; 1200;
1150; 1130; 1040; 840; 790 [cm⁻¹]

4. Quantitative Bestimmung der Keimungshemmstoffe aus Sorbus aucuparia

4.1 Quantitative Bestimmung der Parasorbinsäure

4.1.1 Quantitative Bestimmung der Parasorbinsäure in ganzen Früchten

Es wird ein Rohextrakt aus 50 g Früchten in 250 ml bidestilliertem Wasser hergestellt, wie unter III.A.1.1 beschrieben. Dieser wird abfiltriert, das Volumen bestimmt und damit eine HPLC-Analyse durchgeführt. Als Vergleich dient eine 10⁻³ Molare Lösung synthetischer Parasorbinsäure.

HPLC-Pumpe : Gynkotec Mod 300 C
Säule : RP 8 15 cm (Fa Altech)
Elutionsmittel : Wasser mit verd. Schwefelsäure auf pH 3 eingestellt
Flowrate : 2 ml/min
Detektion : Durchflußspektrometer bei 213 nm

Zur Bestimmung des Gehaltes an Parasorbinsäure werden die Flächen der Peaks ausgeschnitten und gewogen. Es wird der Durchschnitt von 3 Einspritzungen genommen. Der Gehalt wird von 3 unabhängig angesetzten Rohextrakten bestimmt.

4.1.2 Quantitative Bestimmung der Parasorbinsäure in isolierten Samen

Aus 1 kg Früchten werden 14,8 g Samen auf folgende Weise isoliert. Die bei -20°C aufbewahrten Samen werden in flüssigen Stickstoff gegeben. Portionsweise werden die Früchte in Alufolie gewickelt und mit einem Hammer zerkleinert. Die Samen lassen sich nun mit einer Pinzette vom Fruchtfleisch isolieren. Um minimale Reste an Fruchtfleisch zu entfernen, werden die Samen mehrfach mit Wasser gewaschen (die Samen fallen nach unten, das Fruchtfleisch schwimmt auf dem Wasser). Die Samen werden an der Luft getrocknet und gewogen. Danach gibt man sie in einen Mörser und zerkleinert sie unter flüssigem Stickstoff. Die zerkleinerten Samen werden mit 50 ml bidest. Wasser für 24 Stunden unter Rückfluß gekocht und anschließend die Bestimmung der Parasorbinsäure wie unter III.A.4.1 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind unter IV.A.3.1 dargestellt.

4.2 Quantitative Bestimmung der Isopropyläpfelsäure

Die nach III.A.1.4.2.2 gewonnene Fraktion wird auf den Gehalt an Isopropyläpfelsäure als Isopropyläpfelsäuredimethylester gaschromatographisch untersucht (GC-Bedingungen siehe III.A.2.1). Als Vergleich dient die nach III.A.3.2 synthetisierte Isopropyläpfelsäure. Zu den Ergebnissen siehe IV.A.3.2.

4.3 Quantitative Bestimmung der Abscisinsäure

4.3.1 Quantitative Bestimmung der Abscisinsäure in Früchten

Die nach III.A.1.4.3.1 gewonnenen Fraktionen werden auf den Gehalt an Abscisinsäure als Abscisinsäuremethylester mittels Gaschromatographie untersucht (GC-Bedingungen siehe III.A.2.1). Als Vergleich wird Abscisinsäure (Fa Sigma Nr. A-1012) eingesetzt. Zu den Ergebnissen siehe IV.A.3.3.

4.3.2 Quantitative Bestimmung der Abscisinsäure in Samen

Die Samen von 500 g Vogelbeeren werden vom Fruchtfleisch getrennt und zerkleinert wie unter III.A.4.1.2 beschrieben. Anschließend werden sie mit 250 ml bidest Wasser versetzt und für 24 Stunden unter Rückfluß gekocht. Zur Extraktion mit Ether wird das Volumen auf 2,5 l mit bidest Wasser ergänzt und dann bei pH 8 und pH 1, wie unter III.A.1.3 bzw III.A.1.4 beschrieben, extrahiert. Die weiteren Aufarbeitungsschritte entsprechen denen der Isolierung und quantitativen Bestimmung in ganzen Früchten (siehe III.A.1.4.1 ; III.A.1.4.3 und III.A.4.3.1 und IV.A.3.3).

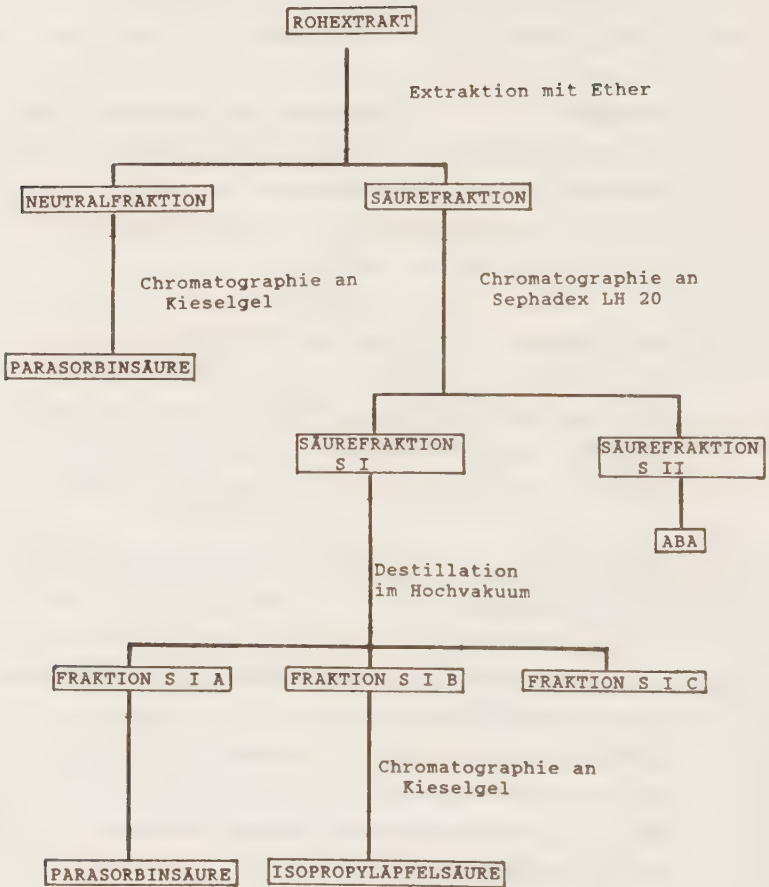
4.3.3 Quantitative Bestimmung der Abscisinsäure im Fruchtfleisch

500 g Fruchtfleisch (ohne Samen) werden aufgearbeitet wie unter Isolierung von Keimungshemmstoffen aus *Sorbus aucuparia* beschrieben. Die quantitative Bestimmung erfolgt wie unter III.A.4.3.1 (siehe auch IV.A.3.3).

5. Bestimmung der Aufnahme von exogen zugesetzter Abscisinsäure in *Amaranthus caudatus* Samen

Der Ansatz von 1000 *Amaranthus caudatus* Samen mit der Abscisinsäurelösung erfolgt in 40 Biotestschälchen wie unter III.C.1.1 beschrieben. Die Konzentration der Abscisinsäure im Ansatz beträgt 10^{-4} Mol/l. Nach 48 Stunden werden die Samen entnommen, und mehrmals mit Wasser gewaschen, eingefroren und mit einem Mörser zerkleinert. Danach werden die Samen mit 50 ml Wasser (bidest) versetzt und für 24 Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach Abkühlen der Lösung wird filtriert, das Filtrat auf pH 1 eingestellt und im Perforator mit peroxidfreiem Ether für 48 Stunden extrahiert. Die Etherphase wird eingengt und der Rest an Wasser durch Gefriertrocknen entfernt. Nach Verestern mit Diazomethan wird der Gehalt an Abscisinsäure als Abscisinsäuremethylester bestimmt (siehe IV.A.5).

6. Aufarbeitungsschema



B Keimungshemmstoffe aus *Thuja occidentalis*

1. Isolierung von Keimungshemmstoffen aus *Thuja occidentalis*

1.1 Gewinnung des Rohextraktes

500 g zerschnittene Thujablätter werden mit 5 l Methanol pA für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Extrakt ist dunkelgrün gefärbt. Nun wird abfiltriert, das Volumen bestimmt. Für die Bestimmung der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* wird das Methanol in den Biotestschälchen abgedampft. Der Extrakt wird am Rotationsverdampfer auf ca 1,5l eingeengt, wobei die Wasserbadtemperatur auf 25°C eingestellt wird (siehe IV.B.2.1).

1.2 Extraktion mit Hexan

Hexan pA wird über eine Kolonne destilliert und anschließend im Gaschromatographen auf Reinheit überprüft. Der eingeengte Rohextrakt wird in einen 2 l Scheidetrichter überführt und mehrfach mit 400 ml Hexan ausgeschüttelt, bis die Hexanphase nur noch hellgrün gefärbt ist (ungefähr 2 l Hexan). Das Hexan wird am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur abgezogen und ein Keimungshemmtest an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* durchgeführt (IV.B.2.1).

1.2.1 Chromatographie der Hexan-Phase an Sephadex LH 20

Die Chromatographie erfolgt wie unter III.A.1.4.1 beschrieben. Die Keimungshemmung wird von jeder fünften Fraktion an *Amaranthus caudatus* bestimmt. Die Fraktionen mit Keimungshemmung werden vereinigt und mit peroxidfreiem Ether (siehe III.A.1.2) ausgeschüttelt. Nach Trocknen der Etherphase über

Natriumsulfat wird die Fraktion gaschromatographisch und mittels GC-MS untersucht (siehe III.A.2 und IV.B.2.2).

1.3 Extraktion mit Methylenchlorid

Technisches Methylenchlorid wird über eine Kolonne destilliert. Der methanolische Rückstand der Hexanextraktion wird mit bidest Wasser (ca 300 ml) versetzt und mit Schwefelsäure auf pH 5 eingestellt (man erreicht dadurch eine bessere Phasentrennung). Nun schüttelt man mehrfach mit Methylenchlorid aus , bis die Methanolphase nur noch hellgelb gefärbt ist (ungefähr 1,5 l Methylenchlorid). Das Methylenchlorid wird am Rotationsverdampfer abgezogen und die Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* bestimmt (siehe IV.B.2.1).

1.3.1 Chromatographie der Methylenchlorid-Phase an Kieselgel Si 60

Das Kieselgel wird vorbereitet wie unter III.A.1.3.1 beschrieben. Die Säule (4,5 cm Durchmesser ; 45 cm Länge) wird mit Kieselgel Si 60 in Hexan gefüllt. Mit Hilfe eines Tropftrichters wird die Säule 6 Stunden mit Hexan gespült. Danach wird das gesamte Material der Methylenchlorid-Phase auf die Säule aufgetragen und folgender Stufengradient angeschlossen :

1. 250 ml Hexan
2. 800 ml Hexan-Essigester 50 : 50
3. 250 ml Essigester
4. 250 ml Aceton
5. 500 ml Methanol

Die Polaritätsmischung Hexan-Essigester 50 : 50 wird in zwei Fraktionen aufgeteilt. Die erste Fraktion ist farblos und besteht aus ca 300 ml. Die zweite Fraktion ist dunkelgrün gefärbt und enthält ca 500 ml. Die einzelnen Fraktionen werden am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur eingeeengt und anschließend auf Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* untersucht (siehe IV.B.2.3.1).

1.3.2 Chromatographie der zweiten Hexan-Essigester-Fraktion an Sephadex LH 20

Die zweite Fraktion der Polaritätsmischung Hexan-Essigester 50:50 der Chromatographie an Kieselgel Si 60 (siehe III.B.1.3.1) wird an Sephadex LH 20 weiter aufgereinigt. Die Chromatographie erfolgt wie unter III.A.1.4.1 beschrieben. Es wird jede fünfte Fraktion auf Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* untersucht. Die Fraktionen mit Bioaktivität (Fraktion I umfaßt die Fraktionen 45-100 und Fraktion II die Fraktionen 101-140) werden vereinigt und die Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* bestimmt (siehe IV.B.2.3.2).

1.3.3 Extraktion der Fraktion I mit peroxidfreiem Ether bei pH 8 (Neutralfraktion)

Die Fraktion I der Chromatographie an Sephadex LH 20 wird mit einer 5%igen Natriumhydrogencarbonat-Lösung auf pH 8 eingestellt und dreimal mit Ether extrahiert. Nach Trocknen der Etherphase über Natriumsulfat wird der Ether am Rotationsverdampfer abgezogen und die Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* bestimmt. Aus dieser Fraktion werden die vorhandenen Monoterpenketone durch Abziehen am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 40°C entfernt und mögliche Verluste an Keimungshemmung mittels Biotest überprüft. Die Fraktion wird gaschromatographisch untersucht (siehe III.A.2.1). Für die Dünnschichtchromatographie werden Dünnschichtplatten mit Fluoreszenzindikator (Merck Nr 5729) eingesetzt. Als Fließmittel dient Hexan-Essigester 50:50. Die Platten werden zunächst im UV bei 254 nm und 366 nm betrachtet und anschließend in einer Iodkammer entwickelt (siehe IV.B.2.4 und IV.B.2.5.1).

1.3.3.1 Destillation der Neutralfraktion im Hochvakuum

Die Neutralfraktion einer Aufarbeitung wird in einen 10 ml Spitzkolben mit Ether überführt und im Hochvakuum (0,5 Torr) bei 80°C und 120°C jeweils

für eine Stunde destilliert. Die Fraktionen werden in einen Keimungshemmtest an *Amaranthus caudatus* eingesetzt. Anschließend untersucht man sie gaschromatographisch (siehe III.A.2.1 und IV.B.2.5.2).

1.3.3.2 Chromatographie der Neutralfraktion an Kieselgel Si 60

Die Neutralfraktion (siehe III.B.1.3.3) wird an Kieselgel Si 60 chromatographiert. Die Vorbereitung des Kieselgels erfolgt analog (III.A.1.3.1). Die Säule hat einen Durchmesser von 2,3 cm und eine Länge von 22 cm. Das Kieselgel wird in Hexan-Essigester 90:10 aufgenommen. Es wird folgender Stufengradient angeschlossen:

1. 100 ml Hexan-Essigester 70:30
2. 100 ml Hexan-Essigester 60:40
3. 100 ml Hexan-Essigester 50:50
4. 100 ml Hexan-Essigester 40:60
5. 100 ml Hexan-Essigester 30:70
6. 100 ml Hexan-Essigester 20:80
7. 100 ml Essigester

Die einzelnen Fraktionen werden eingengt und auf Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* geprüft. Anschließend werden sie gaschromatographisch (siehe III.A.2.1) und mittels Dünnschichtchromatographie (siehe III.B.1.3.3 und IV.B.2.5.3) untersucht.

1.3.4 Extraktion der Fraktion I mit peroxidfreiem Ether bei pH 1 (Säurefraktion)

Der wässrige Rückstand der bei pH 8 ausgeschüttelten Fraktionen 45-100 der Chromatographie an Sephadex LH 20 (siehe III.B.1.3.2 und III.B.1.3.3) wird mit verd. Schwefelsäure auf pH 1 eingestellt und dreimal mit peroxidfreiem Ether (III.A.1.2) ausgeschüttelt. Die vereinigten Etherphasen werden über Natriumsulfat getrocknet, der Ether am Rotationsverdampfer abgezogen und ein Keimungshemmtest an *Amaranthus caudatus* durchgeführt (siehe IV.B.2.4).

1.4 Extraktion mit Essigester

Der Rückstand der Methylenchlorid-Extraktion (siehe III.B.1.3) wird dreimal mit insgesamt 1,5 l Essigester ausgeschüttelt. Der Essigester wird am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur entfernt. Anschließend führt man einen Keimungshemmtest an *Amaranthus caudatus* durch. Auch der Rückstand wird auf eventuell noch verbleibende Keimungshemmung getestet.

2. Versuche zur Identifizierung der Keimungshemmstoffe aus Thuja occidentalis

Das Material einer Aufarbeitung der Neutral- und Säurefraktion (siehe III.B.1.3.3.2 und III.B.1.3.4) wurde jeweils in 5 ml Ether (wasserfrei) aufgenommen. Die Vergleichssubstanzen werden in 10^{-2} Mol/l in Ether gelöst.

2.1 Acetylierung mit Acetylchlorid

Vergleichslösungen: Borneol; Citronellol; α -Terpineol (jeweils 10 μ l einer 10^{-2} Mol/l Lösung in Ether).

Probenlösung: Das Material einer Aufarbeitung der jeweiligen Fraktion wird in 5 ml Ether gelöst. 20 μ l Thuja-Neutralfraktion und 100 μ l Thuja-Säurefraktion (die Säurefraktion wird vorher mit Diazomethan behandelt) werden eingesetzt.

Die Substanzen werden in 8 ml Schliffröhrchen (die Röhrchen werden vorher bei 110°C getrocknet) gegeben. Nach Verdunsten des Ethers wird zu jeder Probe 100 μ l Acetylchlorid gegeben und die Röhrchen sofort mit einem Schliffstopfen verschlossen. Nach 15 min bei Raumtemperatur, zieht man das überflüssige Acetylchlorid am Rotationsverdampfer ab. Zu jeder Probe wird 1 ml Ether pipettiert und danach eine GC-MS-Analyse angefertigt (siehe IV.B.3.1.1 und IV.B.3.2.2).

Die Massenspektren werden angegeben mit m/z und (rel. Intensität):

Bornylacetat : 43 (100); 95 (95); 93 (43); 41 (42); 136 (38); 121 (36);

55 (20); 80 (18); 108 (15); 69 (14); 67 (13); 92 (13); 154 (9)

Citronellylacetat (zwei Isomere): a) 41 (100); 43 (99); 69 (60); 81 (52); 67 (45); 55 (42); 95 (40); 82 (36); 68 (25); 123 (22); 138 (14)
b) 43 (100); 55 (55); 41 (53); 69 (45); 56 (38); 82 (32); 95 (31); 83 (28); 81 (25); 67 (20); 68 (15); 123 (13)

Terpinyl-4-acetat: 43 (100); 121 (48); 93 (46); 136 (30); 41 (22); 59 (15); 67 (12)

2.2 Oxidation mit Kaliumpermanganat

Vergleichslösungen: Bornylacetat; Citronellylacetat; Thujylacetat; 4-Terpinylacetat; α -Terpinylacetat; Thymolacetat (jeweils 10 μ l einer 10^{-2} Mol/l Lösungen in Ether).

Probenlösung: Das Material einer Aufarbeitung der Neutralfraktion wird in 5 ml Ether gelöst. Von dieser Lösung werden 20 μ l in den Test eingesetzt. Die Substanzen werden in 8 ml Schliffreagenzgläser gegeben. Der Ether wird bei jeder Substanz abgezogen und es werden jeweils 50 μ l einer 0,02% igen wässrigen Kaliumpermanganat-Lösung auf den Rückstand pipettiert. Die Proben, bei denen eine sofortige Entfärbung auftritt, werden mit einem Schliffstopfen verschlossen und 5 min im Wasserbad auf 50°C erhitzt. Die nicht entfärbten Proben werden verworfen. Nach Abkühlen gibt man 2 ml dest Wasser in den Ansatz, stellt mit verd. Schwefelsäure auf pH 1 ein und schüttelt dreimal mit Ether aus. Die Etherphase wird über Natriumsulfat getrocknet. Danach filtriert man und zieht den Ether am Rotationsverdampfer vorsichtig ab. Die Proben werden in 1 ml Ether (wasserfrei) aufgenommen und ein GC-MS angefertigt (siehe III.A.2.2 und IV.B.3.1.2). Der Ether wird am Rotationsverdampfer entfernt, die Proben mit Diazomethan verestert. Nach Zugabe von erneut 1 ml Ether wird eine weitere GC-MS-Analyse durchgeführt.

Citronellol wird umgesetzt zu 3,7-Dimethyloctan-1,7-diol und α -Terpineol zu 2-(4-Methylbenzol)propan-2-ol.

Die Massenspektren werden angegeben mit m/z und (rel.Intensität):

3,7-Dimethyloctan-1,7-diol: 43 (100); 59(94); 70(46); 55(40); 61(38);
41(28); 83(25); 69(22); 56(21); 98(18); 42(15); 123(12)
2-(4-Methylbenzol)-propan-2-ol: 135(100); 150(29); 91(20); 115(15);
107(9); 77(9); 51(8)

2.3 Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid

Vergleichslösungen: Fenchon; Campher; Citronellol (jeweils 10 µl einer 10⁻² Mol/l Lösung in Ether).

Probenlösung: Das Material einer Aufarbeitung der Neutralfraktion wird in 5 ml Ether gelöst. Von dieser Lösung werden 20 µl in den Test eingesetzt. 8 ml Schliffröhrchen werden im Trockenschrank bei 110°C getrocknet. Unter Einblasen von trockenem Stickstoff werden sie auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend gibt man die Vergleichs- und Probenlösungen in diese Röhrchen. Nun ergänzt man jeden Ansatz mit trockenem Ether zu einem Endvolumen von 1 ml. Nach Zugabe einer kleinen Spatelspitze Lithiumaluminiumhydrids setzt eine heftige Gasentwicklung ein, und ein weißer Niederschlag entsteht. Die Proben bleiben verschlossen bei Raumtemperatur für 15 min stehen. Danach werden vorsichtig 2 ml Wasser zugesetzt und der pH mit verd. Salzsäure auf 1 eingestellt. Der Niederschlag geht dabei in Lösung. Nun wird der Ansatz mit Ether ausgeschüttelt und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Ethers wird in 1 ml Ether aufgenommen und eine GC-MS-Analyse angefertigt (siehe IV.B.3.1.3 und IV.C.3.1.1).

Die Massenspektren werden angegeben mit m/z und (rel Intensität):

Fenchylalkohol: 81(100); 80(72); 41(40); 69(30); 55(29); 71(25); 72
(24); 67(22); 84(20); 57(20); 82(18); 53(13); 83(13); 93
(12); 111(9);

Borneol: 95(100); 41(62); 43(45); 55(32); 93(23); 67(23); 110(18); 69
(17); 82(12); 71(10); 59(10); 121(9)

2.4 Derivatisierung mit BSTFA

Vergleichslösungen : (jeweils 10 µl einer 10⁻² Mol/l Lösung in Ether)

Säuren : n-Hexansäure ; n-Buttersäure ; Isobuttersäure ; Valeriansäure ; Octandisäure .

Alkohole : Isoamylalkohol ; Octanol ; Geraniol ; Citronellol ; 3-Methyl-3-buten-1-ol .

Probenlösung : Das Material einer Aufarbeitung der jeweiligen Fraktion wird in 5 ml Ether gelöst. 20 µl Thuja-Neutralfraktion und 100 µl Thuja-Säurefraktion werden eingesetzt .

Die Lösungen werden in Röhrchen mit einem Teflon-Schraubverschluß gegeben und der Ether am Rotationsverdampfer abgezogen. Danach gibt man jeweils 200 µl BSTFA hinzu und derivatisiert bei 60°C im Trockenschrank für eine Stunde. Nach Abziehen des Derivatisierungsmittels am Rotationsverdampfer bei 50°C Wasserbadtemperatur fügt man 1 ml Ether hinzu und analysiert im GC-MS (siehe IV.B.3.1.4, IV.B.3.2.1 und IV.C.3.2.1).

Die Massenspektren werden angegeben mit m/z und (rel. Intensität) :

n-Hexansäuretrimethylsilylester : 75 (100) ; 73 (95) ; 45 (23) ; 117 (20) ; 173 (18) ; 43 (18) .

Buttersäuretrimethylsilylester : 75 (100) ; 73 (62) ; 145 (25) ; 45 (18) ; 43 (13) ; 47 (9) ; 117 (5) .

Isobuttersäuretrimethylsilylester : 73 (100) ; 75 (82) ; 145 (25) ; 45 (22) ; 43 (18) ; 74 (10) ; 47 (8) ; 117 (6) .

n-Valeriansäuretrimethylester : 75 (100) ; 73 (77) ; 45 (22) ; 159 (20) ; 117 (12) .

Octandisäure-di-trimethylsilylester : 73 (100) ; 75 (78) ; 55 (52) ; 187 (31) ; 303 (26) ; 169 (22) ; 45 (21) ; 147 (18) ; 129 (18) ; 117 (17) ; 139 (16) ; 149 (15) ; 83 (15) ; 138 (13) .

Isoamyltrimethylsilylether : 89 (100) ; 75 (79) ; 73 (68) ; 145 (54) ; 69 (48) ; 45 (35) ; 103 (27) ; 43 (25) ; 41 (19) .

Octyltrimethylsilylether : 73 (100) ; 103 (82) ; 41 (18) ; 101 (15) ; 75 (20) ; 70 (18) ; 45 (17) ; 143 (13) .

Geranyltrimethylsilylether : 73 (100) ; 75 (62) ; 41 (62) ; 93 (38) ; 69 (37) ;
45 (20) ; 80 (19) ; 121 (16) ; 143 (8) ; 103 (3) .

Citronellyltrimethylsilylether : 81 (100) ; 41 (88) ; 73 (76) ; 67 (58) ; 95 (55) ;
75 (50) ; 82 (49) ; 69 (43) ; 123 (28) ; 55 (28) ; 143 (26) ;
45 (23) ; 43 (19) ; 57 (17) ; 109 (16) ; 59 (15) ; 68 (14) ; 103
(10) .

3-Methyl-3-butenyl-1-trimethylsilylether : 73 (100) ; 103 (52) ; 45 (20) ; -
101 (17) ; 75 (13) ; 59 (12) ; 143 (7) .

2.5 Chromatographie der Säurefraktion an Kieselgel Si 60

Es wird eine Kieselgelsäule hergestellt wie unter III.A.1.4.2.3 beschrieben. Als Polaritätsmischung wird Hexan-Essigester 50 : 50 eingesetzt. Mit dieser Mischung spült man die Säule eine Stunde lang. Danach wird das gesamte Material einer nach III.B.1.3.4 isolierten Säurefraktion aufgetragen. Nun wird mit 20 ml Hexan-Essigester 50 : 50 gespült. Der Hexan-Essigester wird abgezogen. Danach verestert man mit Diazomethan und analysiert gas-chromatographisch (siehe IV.B.3.2.3) .

2.6 Umsetzung von Thujon, Fenchon und Campher mit dest Wasser bei Raum-temperatur

20 µl Thujon, 20 µl Fenchon und eine kleine Spatelspitze Campher werden getrennt in je ein 10 ml Spitzkölbchen gegeben und mit 6 ml dest Wasser versetzt. Die Kölbchen werden mit einem Schliffstopfen verschlossen und für 10 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach stellt man mit 5% iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung den pH auf 8 und schüttelt dreimal mit Ether aus. Anschließend wird mit verd. Schwefelsäure pH 1 eingestellt und wieder mit Ether ausgeschüttelt. Die pH 1- Fraktionen werden über Natriumsulfat getrocknet, mit Diazomethan verestert und ein GC-MS angefertigt (IV.B.3.2.4) .

3. Darstellung von Thujaketosäure

Die Darstellung erfolgt in Anlehnung an die Synthese von Wallach (1892). 10 g Thujon werden in einen 500 ml Rundkolben gegeben und mit einer heißen Lösung aus 30 g Kaliumpermanganat in 400 ml dest Wasser nach und nach versetzt. Der Kolben wird verschlossen und zunächst 20 min geschüttelt. Danach rührt man noch weitere 5 Stunden auf dem Magnetrührer bei Raumtemperatur. Nun wird abfiltriert und das farblose Filtrat zur Trockene eingedunstet, wobei der pH durch Zugabe von verd. Schwefelsäure auf 7 gehalten wird. Es entsteht ein weißer Niederschlag. Dieser wird mit absolutem Ethanol ausgezogen. Nach Einengen des Ethanols entsteht ein gelbes Öl, welches in Ether gelöst wird. Die Etherphase wird mit 5% Natriumhydrogencarbonat-Lösung dreimal ausgeschüttelt. Anschließend wird die wässrige Phase auf pH 1 eingestellt und erneut mit Ether dreimal extrahiert. Nach waschen der Etherphase mit Wasser wird mit Natriumsulfat getrocknet. Danach filtriert man und zieht den Ether am Rotationsverdampfer ab. Es entstehen farblose, blattartige Kristalle.

Ausbeute : 0,72 g = 6% d. Th

Literatur : 41% d. Th

IR : 3200 – 2950 ; 1720 ; 1660 ; 1430 ; 1410 ; 1290 ; 1220 ; 1170 ; 1095 ;
1040 ; 1020 ; 990 ; 940 ; 880 [cm^{-1}]

4. Untersuchungen über die Umwandlung der Monoterpene Thujon und Sabinen

4.1 Kinetik der Umwandlung von Sabinen zu Terpinen-4-ol

4.1.1 Kinetik der Umwandlung von Sabinen zu Terpinen-4-ol in Wasser

Für die Kinetik werden Warburggefäße eingesetzt. Zunächst wird das Volumen der Gefäße, wenn sie mit einem NS 14,5 Schliffstopfen versehen sind, bestimmt. Die Schliffstopfen werden markiert und immer nur mit den entsprechenden Gefäßen, mit denen die Volumenbestimmung durchgeführt

wurde, verwendet. In die Gefäße werden jeweils 2 ml bidest Wasser einpipetiert. In den Kipper gibt man die dem Gefäßvolumen entsprechende Menge in Mikrolitern an Sabinen. Die Proben werden bei 27°C geschüttelt. Für jeden Zeitwert werden zwei Parallelproben angesetzt. Für die Kinetik mit Wasser werden die Proben nach 24, 48, 72, 120, 144 und 216 Stunden wie folgt aufgearbeitet.

Das Wasser wird mit einer Pasteurpipette entnommen und das Volumen bestimmt. Danach schüttelt man das Wasser dreimal mit peroxidfreiem Ether aus. Die vereinigten Etherphasen werden über Natriumsulfat getrocknet und nach Filtrieren das Volumen des Ethers bestimmt. Der Gehalt an Sabinen und Terpinen-4-ol wird gaschromatographisch im Vergleich zu den authentischen Verbindungen bestimmt (siehe IV.B.4.1).

4.1.2 Kinetik der Umwandlung von Sabinen zu Terpinen-4-ol in Wasser unter Zusatz von Erde

Die Proben werden wie unter III.B.4.1.1 beschrieben angesetzt. Zu jeder Probe wird ein Gramm Erde zugesetzt. Es werden Proben nach 2, 4, 6, 8, 24 und 30 Stunden aufgearbeitet. Nach Abfiltrieren der Erde erfolgt die weitere Aufarbeitung und Bestimmung wie unter III.B.4.1.1 beschrieben (siehe IV.B.4.1).

4.2 Kinetik der Oxidation von Thujon zu Thujaketosäure unter Zusatz von Wasser

In die Gefäße werden jeweils 2 ml bidest Wasser gegeben. In den Kipper gibt man die dem Gefäßvolumen entsprechende Menge in Mikrolitern an Thujon. Für jeden Zeitwert werden zwei Parallelproben angesetzt. Die Proben werden bei 27°C geschüttelt. Es werden nach 1, 2, 3, 6, 12 und 18 Tagen je zwei Proben folgendermaßen aufgearbeitet. Das Wasser wird entnommen und das Volumen bestimmt (zunächst sind es 2 ml, später bis zu 1,8 ml). Das Wasser wird auf pH 8 eingestellt und dreimal mit Ether ausgeschüttelt. Nach Trocknen der Etherphase über Natriumsulfat wird der

Ether abfiltriert und das Volumen erneut bestimmt. In dieser Fraktion wird der quantitative Gehalt an α -Thujon gaschromatographisch bestimmt.

Rückstand der pH 8 Phase wird auf pH 1 eingestellt und erneut mit Ether ausgeschüttelt. Nach Trocknen der Etherphase über Natriumsulfat wird abfiltriert, der Ether abgezogen und der Rückstand mit Diazomethan versetzt. Nach 15 min bei Raumtemperatur wird das überschüssige Diazomethan abgezogen, der Rückstand in 100 μ l Aceton aufgenommen und der Gehalt an Thujaketosäure als Thujaketosäuremethylester bestimmt. Als Vergleich wird die nach III.B.3 synthetisierte Thujaketosäure eingesetzt (siehe IV.B.4.2).

5. Untersuchungen über die keimungshemmende Wirkung von Thujon an *Amaranthus caudatus*

Es wird ein Keimungshemmtest mit Thujon an *Amaranthus caudatus* auf unterschiedliche Art angesetzt. Es wird zunächst eine Lösung von 10^{-2} Mol/l Thujon in Ether hergestellt, aus der die Endkonzentrationen im Biotest von 5×10^{-3} , $2,5 \times 10^{-3}$, 10^{-3} , $7,5 \times 10^{-4}$, 5×10^{-4} und $2,5 \times 10^{-4}$ Mol/l hergestellt werden.

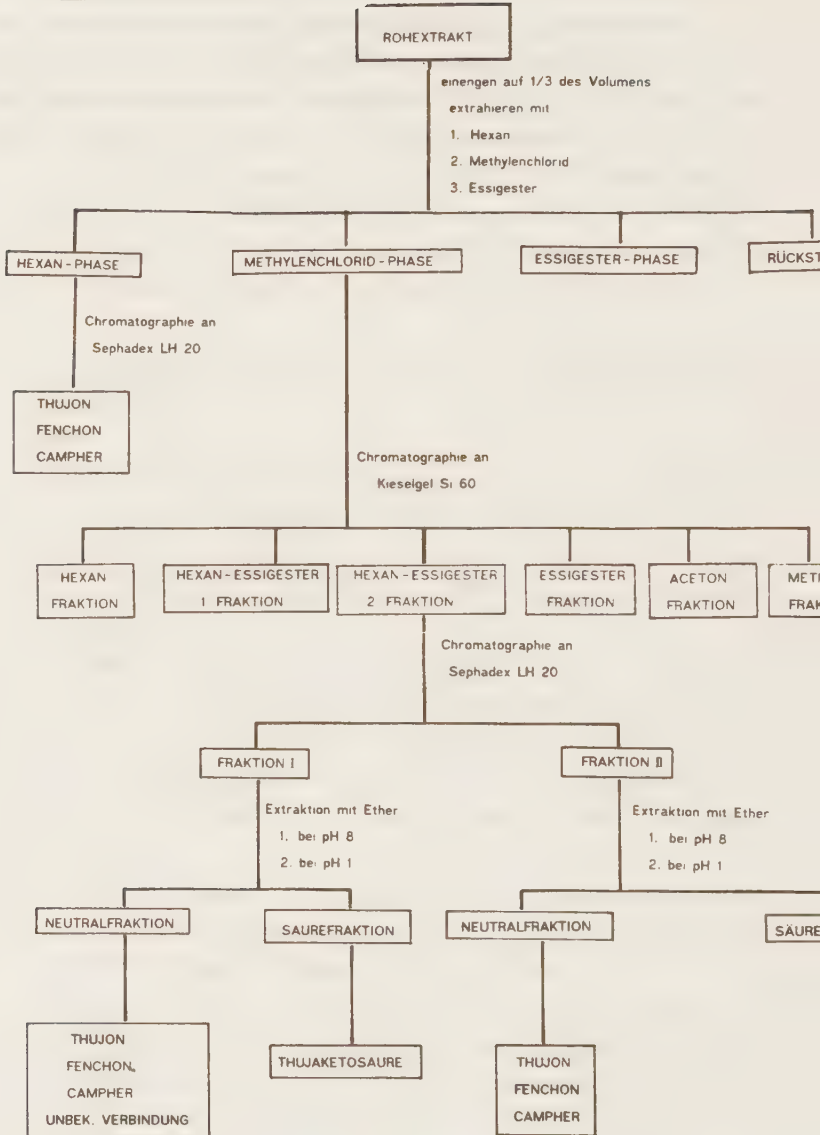
Im einen Fall erfolgt der Ansatz wie unter III.C.1.1 beschrieben. Im anderen Fall wird das Thujon in kleine Glastöpfchen gegeben, die nach Abdunsten des Ethers in die Biotestschalen auf das Filterpapier gestellt werden. Nun gibt man 1 ml Wasser auf das Filterpapier und zählt 25 *Amaranthus caudatus* Samen ein. Die Inkubation und Auswertung erfolgt in beiden Fällen analog III.C.1.1.

Die Konzentration von $2,5 \times 10^{-3}$ Mol/l ist der niedrigste Wert, der in beiden unterschiedlichen Ansätzen Totalhemmung zeigt. Die *Amaranthus caudatus* Samen werden getrennt folgendermaßen aufgearbeitet.

Die Samen werden mit einer Pinzette entnommen, mit Wasser abgespült und auf einem Filterpapier abgetupft, um den größten Teil des Wassers zu entfernen. Nun gibt man sie in einen Mörser, gibt etwas trockenen Ether hinzu und zerkleinert sie unter flüssigem Stickstoff. Der Ether wird in ein 8 ml Schliffröhrchen überführt und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Abfiltrieren

des Ether wird der Gehalt an Thujon gaschromatographisch bestimmt .
Diese Bestimmung wird an drei unabhängig angesetzten Proben durchgeführt .
Im Vergleich dazu erfolgen 3 Ansätze ohne Zugabe von *Amaranthus caudatus*
Samen . Nach 48 Stunden wird das Wasser aus den Petrischälchen entnom-
men , mit Ether ausgeschüttelt und der Gehalt an Thujon bestimmt (siehe
IV.B.5) .

6. Aufarbeitungsschema:



C. Untersuchungen von Keimungshemmstoffen und Strukturanalogen an biologischen Testsystemen

1. Bestimmung der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus*

1.1 Bestimmung der Keimungshemmung während der Isolierungsschritte

Auf jeder Stufe der Isolierung eines Keimungshemmstoffes wird ein Keimungshemmtest an *Amaranthus caudatus* durchgeführt. Zunächst wird das Volumen des Rohextraktes bestimmt (*Sorbus aucuparia* 2600 ml ; *Thuja occidentalis* 5000 ml). 1 ml dieses Extraktes in den Keimungshemmtest eingesetzt dient als Bezugsgröße für alle weiteren Isolierungsschritte. Es wird eine Verdünnungsreihe mit 0,5 ml ; 0,25 ml ; 0,1 ml ; 0,05 ml ; 0,025 ml und 0,01 ml des Extraktes auf ein Endvolumen von 1 ml angesetzt. Für alle folgenden Isolierungsschritte werden die Rückstände des Gesamtextraktes in 2,6 ml (bei *Sorbus*) und 5,0 ml (bei *Thuja*) gelöst. 1 µl dieser Lösungen auf 1 ml verdünnt entspricht der Konzentration des Rohextraktes.

Für die Keimungshemmtests werden Petrischalen mit einem Durchmesser von 5,5 cm mit Rundfiltern (Durchmesser 4,5 cm) versehen. In die so vorbereiteten Schalen gibt man jeweils 1 ml der Lösungen in den verschiedenen Konzentrationen, zählt 25 *Amaranthus caudatus* Samen ein und verteilt sie gleichmäßig auf dem Filterpapier. Sind die Substanzen in organischen Lösungsmitteln gelöst, läßt man diese zunächst Abdunsten und gibt dann 1 ml bidestilliertes Wasser und die Samen hinzu. Die Ansätze werden für 48 Stunden in einem Brutschrank bei 28°C und einer rel. Luftfeuchtigkeit von 80% inkubiert. Die Keimungshemmung wird durch Ausmessen der Wurzellänge im Vergleich zu einem Wasserwert bestimmt.

Die Berechnung der Keimungshemmung erfolgt nach folgender Formel:

$$\% \text{ Keimungshemmung} = 100 - \left[\frac{100 \times \bar{X} \text{ Keimwurzellänge mit Inhibitor}}{\bar{X} \text{ Keimwurzellänge mit Wasser}} \right]$$

1.2 Bestimmung der Keimungshemmung an synthetischen Verbindungen

Die einzelnen Verbindungen werden in den Konzentrationen 10^{-3} ; $7,5 \times 10^{-4}$; 5×10^{-4} ; $2,5 \times 10^{-4}$; 10^{-4} Mol/l in den Keimungshemmtest eingesetzt. Die verwendeten Substanzen sind im Anhang aufgeführt. Der Keimungshemmtest und die Berechnung erfolgt wie unter III.C.1.1 beschrieben (siehe auch IV.D.2).

2. Bestimmung der Keimungshemmung an *Lepidium sativum*

2.1 Bestimmung der Keimungshemmung während der Isolierungsschritte

Das Volumen des Rohextraktes wird bestimmt. 1,5 ml des Extraktes in den Keimungshemmtest eingesetzt dient als Bezugsgröße für alle weiteren Isolierungsschritte. Es wird eine Verdünnungsreihe mit 0,75 ml ; 0,375 ml ; 0,15 ml ; 0,075 ml ; 0,038 ml und 0,015 ml auf ein Endvolumen von 1,5 ml angesetzt. Für alle folgenden Isolierungsschritte werden die Extrakte gelöst wie unter III.C.1.1 beschrieben. 1,5 µl dieser Lösungen auf 1,5 ml verdünnt entspricht der Konzentration des Rohextraktes.

Die Größe der Petrischalen entspricht denen des *Amaranthus caudatus* Testes. Es werden jedoch nur 15 *Lepidium sativum* Samen eingesetzt. Inkubation und Berechnung der Keimungshemmung erfolgt wie unter III.C.1.1 beschrieben.

2.2 Bestimmung der Keimungshemmung an synthetischen Verbindungen

Die einzelnen Verbindungen werden in den Konzentrationen 10^{-3} ; $7,5 \times 10^{-4}$; 5×10^{-4} ; $2,5 \times 10^{-4}$ und 10^{-4} Mol/l in den Keimungshemmtest eingesetzt. Die weitere Durchführung erfolgt analog III.C.2.1. Die getesteten Verbindungen sind im Anhang aufgeführt (siehe auch IV.D.2).

3. Bestimmung der Keimungshemmung an Avena sativa

Zur Vorbereitung werden in Petrischalen mit 9 cm Durchmesser Rundfilter mit 7 cm Durchmesser gegeben. Als Testvolumen werden jeweils 5 ml eingesetzt. Die einzelnen Verbindungen werden in den Konzentrationen 10^{-2} ; 10^{-3} und 10^{-4} Mol/l angesetzt. In jede Petrischale werden 10 entspelzte Avena sativa Samen gegeben. Die Inkubation erfolgt analog III.C.1.1. Anschließend wird die Keimungshemmung durch Ausmessen der längsten Wurzel bestimmt. Die Berechnung erfolgt analog III.C.1.1. Die eingesetzten Verbindungen sind im Anhang aufgeführt (siehe auch IV.D.2).

4. Untersuchungen der α -Amylase-Aktivität

4.1 Bestimmung der α -Amylase-Aktivität an ganzen Karyopsen von Avena sativa

In 50 ml Weithalserlenmeyer-Kölbchen werden Rundfilter mit 4,5 cm Durchmesser gegeben. Die Substanzen werden in Aceton (dest.) oder Ether gelöst und auf das Filterpapier aufgetragen, sodaß sich Endkonzentrationen im Ansatz von 10^{-2} ; 10^{-3} und 10^{-4} Mol/l ergeben. Nach Abdunsten des Lösungsmittels werden 10 ml bidest. Wasser einpipettiert und 20 entspelzte Karyopsen von Avena sativa eingezählt. Als Vergleich setzt man Proben mit der entsprechenden Menge Wasser an. Von jeder Verdünnung werden 4 Parallelproben angesetzt. Die Proben werden 24 Stunden im Dunkeln bei 27°C geschüttelt.

Nach Abtrocknen der Samen wird das Gewicht auf der Analysenwaage bestimmt. Anschließend werden die Samen mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

Für die Aufarbeitung werden die Samen in 20 ml Plastikscintillationsgefäße gegeben, mit 7,5 ml bidest. Wasser versetzt und mit einem Ultraturax (Fa IKA für 3-10 ml) 10 min zerkleinert. Der Ultraturax-Stab wird mit 1,5 ml Wasser nachgewaschen. Die Proben werden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C bis zur weiteren Aufarbeitung aufbewahrt.

Zur Bestimmung der α -Amylase-Aktivität werden die Proben gleichzeitig aufgetaut, in Zentrifugengläser überführt und die Gefäße mit 1 ml bidestilliertem Wasser nachgewaschen. Nun wird für 20 min mit einer Tischzentrifuge zentrifugiert. 0,1 ml des Probenüberstandes werden in 4 ml Plastikkuvetten pipettiert und mit 3,9 ml Test-Combination Glucose (GOD-Perid[®] Methode; Boehringer Mannheim) versetzt. Als Blindwert wird 0,1 ml Wasser eingesetzt. Zur Bestimmung der absoluten Glucose-Konzentration setzt man einen Standard mit 91 μg Glucose / ml Wasser ein. Nun wird 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend die Extinktion bei 737 nm bestimmt (siehe IV.D.3.1).

Die Berechnung der freigesetzten Glucose erfolgt nach folgender Gleichung:

$$\frac{\text{Extinktion (Probe)} \times 9,1 \mu\text{g} \times 100}{\text{Extinktion (Standard)} \times \text{Frischgewicht (mg)}} = \frac{\mu\text{g Glucose}}{\text{mg Frischgewicht}}$$

4.2 Bestimmung der α -Amylase-Aktivität embryofreier Karyopsen von Avena sativa mit Gibberellinsäure-Zusatz

20 Avena sativa Karyopsen werden entspelzt. Der Embryo wird bei jeder Karyopse durch Abschneiden der proximalen Hälfte entfernt. Die Bestimmung erfolgt wie unter III.C.5.1 beschrieben. Anstatt von bidestilliertem Wasser wird eine 10^{-6} Mol/l Gibberellinsäure-Lösung eingesetzt (siehe IV.D. 3.2).

4.3 Exogener Test auf die Hemmung der α -Amylase-Aktivität

Der Test erfolgt in Anlehnung an die Versuche von Murao et al (1981) und Kotaru et al (1987).

Lösungen:

1. 10 mMol Tris-HCl-Puffer pH 7 mit 5 mMol Calciumchlorid
2. 100 mg α -Amylase aus Corn Malt (Sigma Nr A-2771) werden in 40 ml 10 mMol Tris-HCl-Puffer pH 7 mit 5 mMol Calciumchlorid gelöst.

3. 1.5 % lösliche Stärke in 100 mMol Tris-HCl-Puffer pH 7

4. Säuremix (1 ml 0,5 N Salzsäure und 5 ml 0,5 N Essigsäure)

5. Iodlösung (0,005% Iod und 0,05% Kaliumiodid).

Es werden die Substanzen in den Test eingesetzt, die bei den Versuchen unter 5.2 eine Hemmung der α -Amylase-Aktivität von mindestens 50% bei einer 10^{-3} Mol/l Konzentration zeigten. Die Substanzen werden in einer 2×10^{-2} Mol/l Konzentration in Ether angesetzt. Es wird folgender Testansatz mit je zwei Parallelproben durchgeführt.

a. 1000 μ l Lösung 1

b. 360 μ l Lösung 1 und 640 μ l Lösung 2

c. 500 μ l Substanz ; Lösungsmittel abdunsten lassen ; danach 1000 μ l Lösung 1 hinzugeben mixen (Konzentration 10^{-2} Mol/l).

d. 50 μ l Substanz ; Lösungsmittel abdunsten lassen ; danach 1000 μ l Lösung 1 hinzugeben und mixen (Konzentration 10^{-3} Mol/l).

e. 5 μ l Substanz ; Lösungsmittel abdunsten lassen ; danach 1000 μ l Lösung 1 hinzugeben und mixen (Konzentration 10^{-4} Mol/l).

f. Substanzmenge wie unter c.; danach 360 μ l Lösung 1 hinzugeben und mixen und 640 μ l Lösung 2.

g. Substanzmenge wie unter d.; danach 360 μ l Lösung 1 hinzugeben und mixen und 640 μ l Lösung 2.

h. Substanzmenge wie unter e.; danach 360 μ l Lösung 1 hinzugeben und mixen und 640 μ l Lösung 2.

Die Ansätze bleiben für 30 min bei Raumtemperatur stehen. Danach gibt man 2 ml Lösung 3 hinzu und inkubiert für 10 min bei 37°C. Anschließend wird die Reaktion mit 5 ml Lösung 4 gestoppt. Von jedem Ansatz werden 100 μ l in je ein Reagenzglas gegeben und 5 ml Lösung 5 einpipettiert. Nach 30 min wird die Extinktion bei 660 nm bestimmt .

Die Berechnung der Hemmwirkung der α -Amylase erfolgt nach folgender Formel :

A = Blindwert ohne α -Amylase

B = Blindwert mit α -Amylase

C = Probe ohne α -Amylase

D = Probe mit α -Amylase

$$\% \text{ Hemmwirkung} = \left[1 - \frac{(C - D)}{(A - B)} \right] \times 100$$

Die Ergebnisse der getesteten Substanzen sind unter IV.D.3.3 aufgeführt .

IV. ERGEBNISSE

A. Keimungshemmstoffe aus *Sorbus aucuparia*

1. Einleitung

Von Namvar und Spethmann (1985) wird eine ausgeprägte Keimruhe aller *Sorbus*-Arten beschrieben. Das Fruchtfleisch sollte auf jeden Fall vom Samen getrennt werden, da sonst ein langsames Auskeimen mit einer schlechteren Keimrate erfolgt (z.B. wurde bei zweijährigen Samen eine Keimrate von 20% bis 30% bestimmt).

Ein schlechtes Auskeimen von Samenmaterialien ist oft ein Hinweis auf die Anwesenheit von Keimungshemmstoffen. Bereits 1859 wurde von Hofmann (1859) aus *Sorbus aucuparia* ein farbloses Öl isoliert und mit dem Namen Parasorbinsäure bezeichnet. Die Struktur dieser Verbindung konnte jedoch erst 1943 von Kuhn und Jerchel (1943) aufgeklärt werden. Kuhn et al (1943) testeten Parasorbinsäure an *Lepidium sativum* (Kresse) und stellten eine keimungshemmende Wirkung fest. Des weiteren wurde die keimungshemmende Wirkung der Parasorbinsäure an *Sinapis alba* (Buston und Roy, 1949) und Kartoffelknollen (Moewus und Schader, 1951) untersucht. Sie liegt bei allen Samen im millimolaren oder höheren Konzentrationsbereich.

Tscheche et al konnten 1971 Parasorbosid, das Glykosid der Parasorbinsäure, isolieren und die Struktur aufklären. Sie konnten keine fungistatische Wirkung des Parasorbosids und seines Aglykons feststellen.

Wepplo (1987) konnte nachweisen, daß die Parasorbinsäure in Preiselbeeren ebenfalls als Glykosid vorliegt, und testete die Keimungshemmung des Glykosids an *Triticum aestivum* im Vergleich zur Parasorbinsäure. Er bestimmte eine 50% ige Keimungshemmung für das Glykosid bei 19,6 mMol und für Parasorbinsäure bei 2,2 mMol. Die Keimungshemmung des Glykosids ist also ungefähr eine Zehnerpotenz schlechter als die der Parasorbinsäure.

Da in den Früchten von *Sorbus aucuparia* fast ausschließlich das Parasorbosid vorliegt, kann die ausgeprägte Keimruhe der *Sorbus*-Samen nicht allein auf der Anwesenheit dieses Stoffes beruhen. Es ist zu erwarten, daß noch weitere Substanzen in den Früchten vorhanden sind, die Keimungshemmung bewirken.

Es sollte untersucht werden, ob noch weitere Keimungshemmstoffe in den Früchten von *Sorbus aucuparia* nachzuweisen sind.

2. Isolierung von Keimungshemmstoffen aus Vogelbeeren

2.1 Extraktion

Zunächst wird durch Kochen mit bidestilliertem Wasser ein Rohextrakt hergestellt. Dieser Extrakt wird als nächstes mit Ether bei pH 8 extrahiert. Alle neutralen organischen Stoffe werden dabei, nach dem Prinzip der Verteilung zwischen zwei Phasen, in die Etherphase überführt. Diese Fraktion wird im weiteren Text als Neutralfraktion bezeichnet (siehe III.A.1.3). Carbonsäuren und Phenole liegen bei pH 8 als Salze bzw. Phenolationen vor und sind daher besser wasser- als etherlöslich. Wird der pH auf 1 eingestellt, werden diese Stoffe unpolarer und können so in die Etherphase überführt werden. Diese Fraktion wird im folgenden Text als Säurefraktion bezeichnet (siehe III.A.1.4). Zur Kontrolle, ob noch weitere Substanzen in gebundener und in dieser Form wasserlöslich vorliegen, wurde in Vorversuchen eine Verseifung mit Ammoniak bei pH 11 durchgeführt und anschließend bei pH 1 mit Ether extrahiert. Diese Fraktion wird im weiteren Text mit verseifte Fraktion bezeichnet (siehe III.A.1.5).

2.1.1 Vergleich der Keimungshemmung des Rohextraktes mit den Etherextrakten an *Amaranthus caudatus*

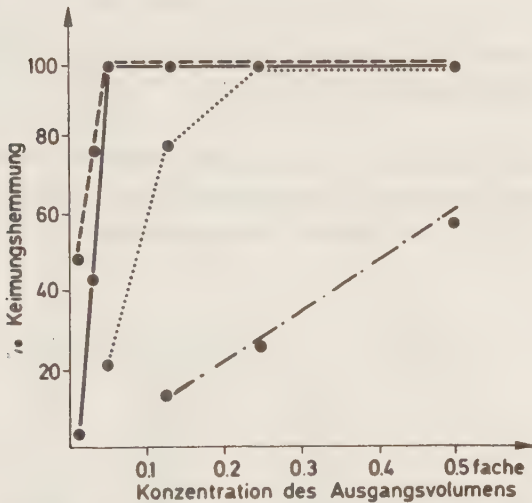


Abb.1: Vergleich der Keimungshemmung von Rohextrakt und Etherextrakten aus *Sorbus aucuparia* an *Amaranthus caudatus*: Rohextrakt (---); Neutralfraktion (—); Säurefraktion (.....) und verseifte Fraktion (-.-.-).

Abb.1 zeigt den Vergleich der Etherextrakte mit dem Rohextrakt. Aufgetragen wurde die Keimungshemmung in Prozent gegen die Konzentration des Ausgangsvolumens. Ein Milliliter des nach III.A.1.1 gewonnenen Rohextraktes in den Keimungshemmtest eingesetzt, entspricht der einfachen Konzentration des Ausgangsvolumens. 0,5 ml des Rohextraktes auf ein Endvolumen von einem ml verdünnt entspricht dann der 0,5 fachen Konzentration des Ausgangsvolumens (in der Abbildung die höchste Konzentration). Der Rohextrakt (gestrichelte Linie) zeigt eine Keimungshemmung bis zu einer 100 fachen Verdünnung. Dies entspricht Werten, die von Lohaus et al. (1985) bei der Untersuchung von *Rosa canina* erzielt wurden. Die Neutralfraktion - (durchgezogene Linie) enthält den größten Anteil der keimungshemmenden

Verbindungen. In der Säurefraktion (punktierte Linie) sind weitere Keimungshemmstoffe enthalten. Die verseifte Fraktion (strichpunktierte Linie) beinhaltet nur eine unbedeutende Restaktivität.

2.1.2 Vergleich der Keimungshemmung des Rohextraktes mit den Etherextrakten an *Lepidium sativum*

Um zu untersuchen, ob man mit unterschiedlichen Samenmaterialien zu strukturell unterschiedlichen Keimungshemmstoffen gelangen kann, wurden die Extrakte zusätzlich an *Lepidium sativum* getestet.

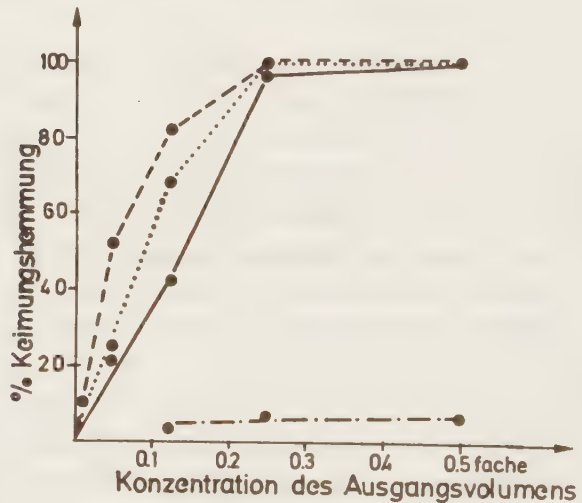


Abb.2: Vergleich der Keimungshemmung von Rohextrakt und Etherextrakten aus *Sorbus aucuparia* an *Lepidium sativum*: Rohextrakt (---); Neutralfraktion (—); Säurefraktion (.....) und verseifte Fraktion (- · - · -).

Abb.2 zeigt den Vergleich der Keimungshemmung des Rohextraktes (gestrichelte Linie) mit den Etherextrakten der Neutralfraktion (durchgezogene Linie), der Säurefraktion (punktierte Linie) und der verseiften Fraktion (strichpunktierte Linie).

(strichpunktierte Linie). Die Keimungshemmung verteilt sich bei diesem Test zu fast gleichen Teilen auf Neutral- und Säurefraktion . In der verseiften Fraktion ist mit 7 % bei einer 0,5fachen Konzentration des Ausgangsvolumens praktisch keine Keimungshemmung mehr vorhanden .

2.1.3 Vergleich der Keimungshemmung der Etherextrakte an *Amaranthus caudatus* mit *Lepidium sativum*

Um die Unterschiede der einzelnen Samenmaterialien zu verdeutlichen werden die Etherextrakte im Vergleich aufgetragen.

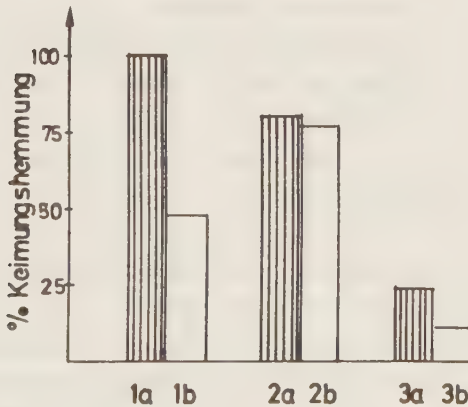


Abb.3: Vergleich der Keimungshemmung bei der 0,125 fachen Konzentration des Ausgangsvolumens an *Amaranthus caudatus* (a) und *Lepidium sativum* (b) . Neutralfraktion (Nr.1) ; Säurefraktion (Nr.2) und verseifte Fraktion (Nr.3) .

In der Abb.3 ist der Vergleich der Keimungshemmung bei der 0,125 fachen Konzentration des Ausgangsvolumens dargestellt. Die Neutralfraktion (Nr.1) zeigt an *Amaranthus caudatus* (a) eine höhere Keimungshemmung als an

Lepidium sativum (b). Die Verbindungen der Neutralfraktion sind an *Amaranthus caudatus* entweder wesentlich aktiver , oder in der Fraktion sind zusätzlich Stoffe enthalten , die ausschließlich an *Amaranthus caudatus* Keimungshemmung bewirken. Die Säurefraktion (Nr.2) zeigt im Vergleich der beiden Samenmaterialien keine gravierenden Unterschiede. Dieses Ergebnis läßt drei Interpretationen zu.

1. Es liegt eine Verbindung vor, die an beiden Samenmaterialien dieselbe Bioaktivität besitzt und deshalb gleiche Keimungshemmung bewirkt.
2. Es wirken zwei unterschiedliche Stoffe auf jeweils einen Samen . Die Übereinstimmung ist zufällig .
3. Es liegt ein komplexeres Gemisch von keimungshemmenden Substanzen vor , das die gleiche Bioaktivität ergibt .

Die verseifte Fraktion (Nr.3) enthält bei beiden getesteten Samen keine entscheidende Bioaktivität mehr. Die verseifte Fraktion wurde nicht weiter bearbeitet . Zunächst wurde die Neutralfraktion untersucht.

2.2 Aufarbeitung der Neutralfraktion

Zur weiteren Aufreinigung der Neutralfraktion wurde an Kieselgel Si 60 chromatographiert. Dabei erfolgt eine Auftrennung von Substanzgemischen aufgrund unterschiedlicher Polaritäten einzelner Verbindungen. Es wurde ein Hexan-Essigester-Stufengradient angelegt (siehe III .A.1.3.1). Da bei der Neutralfraktion an *Amaranthus caudatus* eine höhere Keimungshemmung als an *Lepidium sativum* nachgewiesen wurde, wurde bei den einzelnen Isolierungsschritten die Keimungshemmung ausschließlich an *Amaranthus caudatus* bestimmt. Keimungshemmung wurde in den Fraktionen Nr.5 (Hexan-Essigester 50 : 50) und Nr.6 (Hexan-Essigester 25 : 75) gefunden. Beide Fraktionen enthielten ein farbloses Öl mit stechendem Geruch. In der Annahme ,daß es sich bei beiden Fraktionen um ein und dieselbe Verbindung handeln könnte , wurden sie vereinigt und im Hochvakuum bei 70°C destilliert. Die keimungshemmende Verbindung erwies sich als flüchtig.

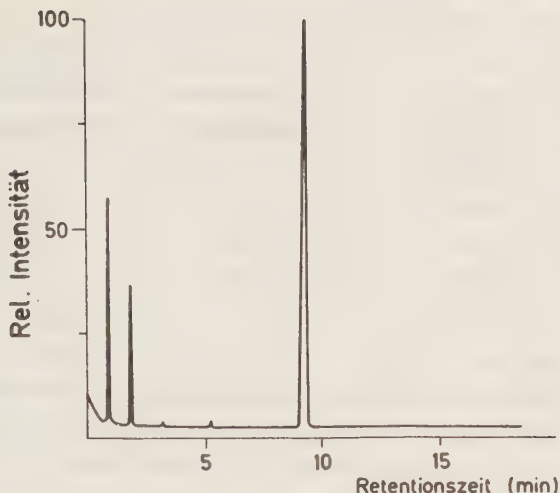


Abb.4: Gaschromatogramm des keimungshemmenden Destillats der Neutralfraktion Säule: Quarzkapillare SE 54, 20 m; Trägergas: Helium (Flußrate $2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$); Temperaturprogramm: 50°C bis 250°C mit $5^\circ\text{C}/\text{min}$; Injektor: 240°C ; Injektion: splitlos auf die kalte Säule; Detektor: FID

Abb.4 zeigt das Gaschromatogramm des keimungshemmenden Destillats. Es ist eine Komponente mit einer Retentionszeit von 10 min enthalten (die beiden Peaks direkt im Anschluß an den Lösungsmittelpeak sind Spuren an Verunreinigung des Lösungsmittels). Die Identifizierung der Verbindung erfolgte mittels GC-MS (siehe IV.C.2.1) und ergab Parasorbinsäure. Zur Bestätigung, daß außer Parasorbinsäure kein weiterer Keimungshemmstoff in der Neutralfraktion vorhanden ist, wurde eine Synthese der Parasorbinsäure durchgeführt (III.A.3.1) und die Keimungshemmung miteinander verglichen.

Tab.1: Vergleich der Keimungshemmung der Neutralfraktion mit synthetischer Parasorbinsäure an *Amaranthus caudatus*

Konzentration [Mol/l]	% Keimungshemmung an <i>Amaranthus caudatus</i>	
	Neutralfraktion	Parasorbinsäure
$1,0 \times 10^{-3}$	100	100
$7,5 \times 10^{-4}$	100	100
$5,0 \times 10^{-4}$	100	88
$2,5 \times 10^{-4}$	25	18

Tab.1 zeigt den Vergleich der Keimungshemmung der Neutralfraktion mit synthetischer Parasorbinsäure. Die Konzentration in der Neutralfraktion wurde mittels Gaschromatographie im Vergleich zu synthetischer Parasorbinsäure bestimmt. Die Keimungshemmung bei $5,0 \times 10^{-4}$ Mol/l ist bei der synthetischen Parasorbinsäure etwas niedriger, liegt aber im Fehlerbereich des Keimungshemmtestes wie auch die Werte für die niedrigere Konzentration von $2,5 \times 10^{-4}$ Mol/l. Es ist also kein anderer Keimungshemmstoff in der Neutralfraktion vorhanden, der an *Amaranthus caudatus* Keimungshemmung bewirkt.

2.2.1 Vergleich der Keimungshemmung der nicht aufgereinigten Neutralfraktion mit Parasorbinsäure an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum*

Tab.2 zeigt den Vergleich der Keimungshemmung der 0,125fachen Konzentration des Ausgangsvolumens der Neutralfraktion vor Aufreinigung mit synthetischer Parasorbinsäure in der Konzentration von $1,0 \times 10^{-3}$ Mol/l. Die Übereinstimmung der Keimungshemmung an *Lepidium sativum* ist im Bereich der Fehlergrenze des Biotestes. Dies läßt den Schluß zu, daß kein weiterer Keimungshemmstoff in der Neutralfraktion vorhanden ist, der an *Lepidium sativum* Aktivität zeigt. Nimmt man gleiche molare Konzentrationen für gleiche Keimungshemmung an, so läßt sich ein quantitativer Gehalt an Parasorbinsäure errechnen. Es ergibt sich ein Wert von 2,2 g Parasorbinsäure

in 500 g Ausgangsmaterial.

Tab.2: Vergleich der Keimungshemmung der nicht aufgereinigten Neutralfraktion mit Parasorbinsäure an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum*

	% Keimungshemmung	
	<i>Amaranthus caudatus</i>	<i>Lepidium sativum</i>
0,125 fache Konzentration des Ausgangsvol. d.		
Neutralfraktion (IV.A.1.2)	100	42
Parasorbinsäure		
$1,0 \times 10^{-3}$ Mol/l	100	38

2.3 Aufarbeitung der Säurefraktion

2.3.1 Chromatographie der Säurefraktion an Sephadex LH 20

Sephadex LH 20 ist ein hydroxypropyliertes Dextrangel. Die Auftrennung erfolgt teilweise nach dem Prinzip der Verteilung, teilweise durch Adsorption. Nach Untersuchungen von Brook und Munday (1970) werden Phenole, Phenolcarbonsäuren, Benzoesäuredeivate und Halogenverbindungen stark an Sephadex LH 20 adsorbiert. Phenole können mit ihrer OH-Gruppe Wechselwirkungen mit den Ethergruppen des Gels eingehen und ihre Adsorption ist außerdem durch ihre Molekülgröße (sie entspricht ungefähr den Hohlräumen des Gels) begünstigt. Über die weitere Anwendbarkeit siehe Sandberg (1981). Lohaus (1981) setzte einen Wasser/Methanol-Stufengradient mit Erfolg zum Eluieren aromatischer Verbindungen ein. Die Säurefraktion wurde an Sephadex LH 20 chromatographiert, wobei ein derartiger Stufengradient (jeweils 2 Säulenvolumina Wasser; Wasser-Methanol 1:1; Methanol) angelegt wurde. Vorversuche zeigten, daß mit Wasser/Methanol und mit

Methanol keine keimungshemmenden Substanzen eluiert werden. Deshalb finden diese Fraktionen im Elutionsdiagramm keine Berücksichtigung.

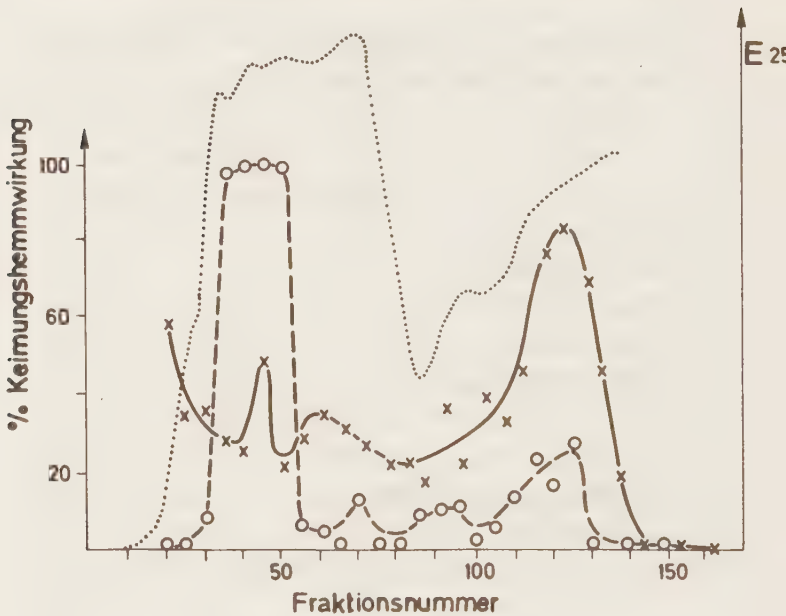


Abb.5: Elutionsdiagramm der Säurefraktion an Sephadex LH 20. Elutionsmittel: Wasser; Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* (----) und an *Lepidium sativum* (—). Gemessen wurde außerdem die Extinktion bei 254 nm (.....).

Abb.5 zeigt das Elutionsdiagramm der Säurefraktion an Sephadex LH 20. Als Elutionsmittel wurde Wasser (bidest) verwendet. Von jeder fünften Fraktion wurde ein Keimungshemmttest an *Amaranthus caudatus* (250 µl der Fraktion auf 1 ml Testvolumen) und an *Lepidium sativum* (375 µl der Fraktion auf 1,5 ml Testvolumen) angesetzt. Die Keimungshemmung verteilt sich auf zwei

Hemmbereiche. Der Bereich I (Fraktionen 30-55) zeigt eine wesentlich höhere Aktivität an *Amaranthus caudatus*, während an *Lepidium sativum* kaum Keimungshemmung nachweisbar ist. Dieser Bereich wird im weiteren Text mit Säurefraktion I bezeichnet. Der Keimungshemmbereich II (Fraktionen 110-130) wirkt an *Lepidium sativum* stärker als an *Amaranthus caudatus*. Zur Isolierung von Keimungshemmstoffen sollten also Samen verschiedener Species herangezogen werden, da bei der Verwendung eines Samenmaterials möglicherweise einzelne Keimungshemmbereiche über- oder unterbewertet werden können. Im Vergleich zu den Keimungshemmtests ist die Extinktion bei 254 nm aufgetragen. Sie verläuft nicht entsprechend der Keimungshemmung. Die Keimungshemmstoffe lassen sich nicht anhand des Extinktionsverlaufes erkennen, da auf dieser Stufe Substanzgemische vorliegen, die eine Extinktion hervorrufen, aber keine Keimungshemmung bewirken. Zunächst wurde die Säurefraktion I weiter aufgereinigt. Da bei diesem Bereich die Keimungshemmung an *Lepidium sativum* gering ist, wurde bei den nächsten Aufreinigungsschritten die Keimungshemmung nur noch an *Amaranthus caudatus* bestimmt.

2.3.2 Aufarbeitung der Säurefraktion I

Vor der weiteren Aufreinigung der Säurefraktion I muß das Elutionsmittel Wasser entfernt werden. Dies kann entweder durch Gefriertrocknung oder durch Extraktion mit Ether erfolgen. Es wurde auf dieser Stufe überprüft, welches Verfahren sich besser eignet. Dazu wurde das Volumen der Säurefraktion einer Aufarbeitung halbiert und eine Hälfte gefriergetrocknet, die andere Hälfte mit verd. Schwefelsäure auf pH 1 eingestellt und mit Ether extrahiert. Anschließend wurde die Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* mit der vor der Chromatographie an Sephadex LH 20 verglichen.

Tab. 3 zeigt den Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* vor und nach der Chromatographie an Sephadex LH 20. Bei der Gefriertrocknung treten größere Verluste auf als bei der Extraktion mit Ether. Dies läßt darauf schließen, daß mindestens eine keimungshemmende Verbindung flüch-

tig ist und deshalb bei der Gefriertrocknung entfernt wird. Alle weiteren Aufarbeitungen wurden mit Ether extrahiert.

Tab.3 : Vergleich der Keimungshemmung von Säurefraktion I an *Amaranthus caudatus* vor der Chromatographie an Sephadex LH 20 (a) mit unterschiedlichen Anreicherungsmethoden nach der Chromatographie an Sephadex LH 20. Keimungshemmung nach Gefriertrocknung (b) und Extraktion mit Ether (c).

Konzentration des Ausgangsvolumens	% Keimungshemmung		
	a	b	c
5,0 fach	100	94	100
2,5 fach	100	60	100
1,0 fach	100	24	55
0,5 fach	69	—	30
0,25 fach	42	—	—

2.3.2.1 Destillation im Hochvakuum

Vier Aufarbeitungen wurden vereinigt und im Hochvakuum destilliert (siehe III. A.1.4.2.1 und III. A.1.4.2.2). Nach Untersuchungen von Lohaus (1981) ergeben sich keine Verluste an Keimungshemmung, wenn man Carbonsäuren in ihre flüchtigeren Methylester überführt.

Es wurden folgende Fraktionen gebildet:

1. Destillation im Hochvakuum bei 70°C (Säurefraktion I a)
2. anschließende Destillation im Hochvakuum bei 70°C nach Veresterung mit Diazomethan (Säurefraktion I b)
3. anschließende Destillation im Hochvakuum bei 150°C nach Veresterung mit Diazomethan (Säurefraktion I c)
4. Rückstand

In der Säurefraktion I c und im Rückstand konnte keine Keimungshemmung nachgewiesen werden.

Tab.4 : Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* : (a) Säurefraktion I a und (b) Säurefraktion I b

Konzentration des Ausgangsvolumens	% Keimungshemmung	
	a	b
20,0 fach	100	97
10,0 fach	100	53
5,0 fach	100	24
2,5 fach	100	—
1,0 fach	27	—

Tab.4 zeigt den Vergleich der Keimungshemmung der destillierten Säurefraktionen Ia und Ib. Der Hauptanteil der Keimungshemmung ist in der Säurefraktion Ia enthalten. Vergleicht man die Keimungshemmung bei ca 25 % , so benötigt man für die Säurefraktion Ib die fünffache Menge gegenüber der Säurefraktion Ia um dieselbe Keimungshemmung zu erzielen. Dies kann entweder auf unterschiedliche Konzentrationen der einzelnen Keimungshemmstoffe oder auf deren Aktivität an *Amaranthus caudatus* zurückzuführen sein.

Die Säurefraktion Ia wurde gaschromatographisch untersucht und ergab ausschließlich Parasorbinsäure . Parasorbinsäure ist relativ gut wasserlöslich , sodaß die Extraktion mit Ether bei pH 8 nicht quantitativ verläuft und Reste in der pH 1 Fraktion nachgewiesen werden.

Die Säurefraktion Ib ergab bei der gaschromatographischen Analyse eine große Anzahl von Verbindungen , jedoch keine Parasorbinsäure (nicht abgebildet) . Diese Fraktion mußte weiter aufgereinigt werden .

2.3.2.2 Chromatographie der Säurefraktion I b an Kieselgel Si 60

Die Fraktion wurde chromatographiert wie unter III.A.1.4.2.3 beschrieben. Es wurden mehrere Kieselgeltrennungen durchgeführt und die nach Gaschromatographie gleichen Fraktionen vereinigt. Bei der Bestimmung der Keimungshemmung ergab sich nur eine Fraktion mit Bioaktivität.

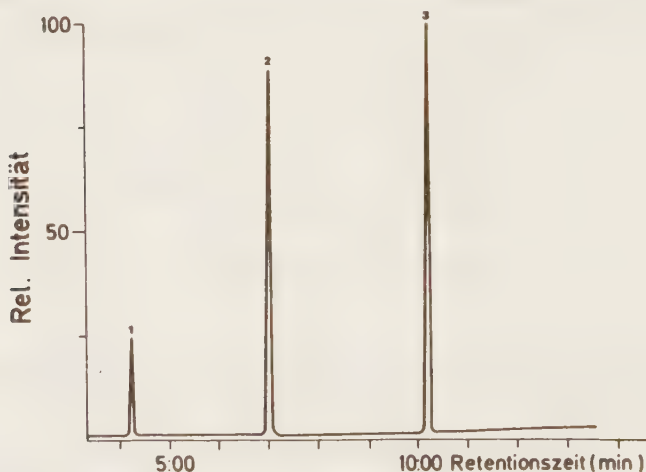


Abb.6: Gaschromatogramm der keimungshemmenden Fraktion nach Chromatographie der Säurefraktion I b an Kieselgel Si 60. Säule: Quarzkapillare SE 54, 20m weitere Bedingungen siehe III.A.2.1.

Abb.6 zeigt das Gaschromatogramm der keimungshemmenden Fraktion nach Chromatographie der Säurefraktion I b an Kieselgel Si 60. Drei Verbindungen sind enthalten, die mittels Massenspektroskopie identifiziert wurden. Es sind dies Bernsteinsäuredimethylester (1), Methoxyäpfelsäuredimethylester (2) und Isopropyläpfelsäuredimethylester (3) (siehe IV.C.2.2). Von Bernsteinsäuredimethylester ist beschrieben (Lohaus et al., 1982), daß er keine Bioaktivität besitzt. Methoxyäpfelsäuredimethylester ist ein Artefakt, das durch Behandlung mit Diazomethan aus Äpfelsäure entsteht. Auf diese Art wurde

Methoxyäpfelsäuredimethylester hergestellt und durch Chromatographie an Kieselgel Si 60 wie für die Säurefraktion I b beschrieben, aufgereinigt. Isopropyläpfelsäure wurde synthetisiert. Die Keimungshemmung beider synthetischer Substanzen wurde mit der isolierten Fraktion verglichen.

Tab.5 : Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* von (a) Isolierte Säurefraktion I b aus *Sorbus aucuparia*, (b) Isopropyläpfelsäuredimethylester und (c) Methoxyäpfelsäuredimethylester

Konzentration [Mol / l]	% Keimungshemmung		
	a	b	c
$7,5 \times 10^{-4}$	100	100	nb *
$5,0 \times 10^{-4}$	100	81	40
$2,5 \times 10^{-4}$	87	71	7

* nicht bestimmt

Tab.5 zeigt den Vergleich der Keimungshemmung der isolierten Fraktion aus *Sorbus aucuparia* mit Isopropyläpfelsäuredimethylester und Methoxyäpfelsäuredimethylester. Methoxyäpfelsäuredimethylester zeigt bei $2,5 \times 10^{-4}$ Mol / l keine signifikante Hemmwirkung mehr, während Isopropyläpfelsäuredimethylester innerhalb der Fehlergrenze des Biotestes mit der isolierten Fraktion übereinstimmt. Isopropyläpfelsäure ist also die Verbindung, die die Keimungshemmung in der isolierten Säurefraktion I b bewirkt.

2.3.3 Aufarbeitung der Säurefraktion II

Die Fraktionen 110-130 der Chromatographie an Sephadex LH 20 wurden vereinigt und das Volumen bestimmt. Vor der weiteren Aufarbeitung wurde ein Keimungshemmtest an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* durchgeführt. Anschließend wurde durch Gefriertrocknung das Wasser entfernt, danach die Fraktion mit Diazomethan verestert und die Keimungshemmung

bestimmt . In Tab.6 ist das Ergebnis dargestellt .

Tab.6: Vergleich der Keimungshemmung der Säurefraktion II vor (a) und nach (b) Gefriertrocknung und Veresterung mit Diazomethan .

Konzentration des Ausgangsvolumens	% Keimungshemmung			
	Amaranthus caudatus		Lepidium sativum	
	a	b	a	b
5,0 fach	58	100	100	100
2,5 fach	26	100	100	100
1,0 fach	—	38	63	43
0,5 fach	—	—	44	30

Auffällig ist das unterschiedliche Verhalten der beiden Samenmaterialien . Die Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* zeigt einen Anstieg in der Keimungshemmung durch die Veresterung mit Diazomethan (Säureform (a) und Methylester (b)). Drei Interpretationen sind denkbar :

1. Diazomethan kann an Doppelbindungen von Molekülen angreifen, sich anlagern und so Artefakte bilden (Black , 1983). Es wäre möglich, daß eine an *Amaranthus caudatus* inaktive Verbindung in eine aktive überführt wird .
2. Durch die Methylierung wird die Verbindung lipophiler , deshalb von *Amaranthus caudatus* Samen besser aufgenommen , und daraus ergibt sich die höhere Aktivität . Wenn bei beiden Samen ein und dieselbe Verbindung aktiv ist , dürfte der lipophile Charakter einer Verbindung an *Lepidium sativum* eine weniger gravierende Rolle für die Keimungshemmung spielen als bei *Amaranthus caudatus* .
3. Durch die Veresterung erreicht man eine Erhöhung der Bindungsfähigkeit am Reaktionszentrum des *Amaranthus caudatus* Samens . Wenn bei beiden Samen dieselbe Verbindung aktiv ist , unterscheiden sich die Reaktionszentren der Samen .

Bei *Lepidium sativum* treten keine Unterschiede in der Keimungshemmung

auf. Es wurde deshalb davon ausgegangen, daß keine Verluste an Keimungshemmung durch die Gefriertrocknung auftreten.

2.3.3.1 Chromatographie an Kieselgel Si 60

Da im Bereich der Säurefraktion II die Anwesenheit von Abscisinsäure möglich ist (Lohaus, pers. Mitteilung), wurde die Fraktion mittels Dünnschichtchromatographie auf Abscisinsäure untersucht (siehe Abb.7a). Das Dünnschichtchromatogramm zeigt neben ABA weitere Verbindungen, deshalb wurde die Fraktion an Kieselgel Si 60 weiter aufgereinigt (siehe III.A.1.4.3.1) und die Aufreinigung durch Dünnschichtchromatographie überprüft (Abb.7b).

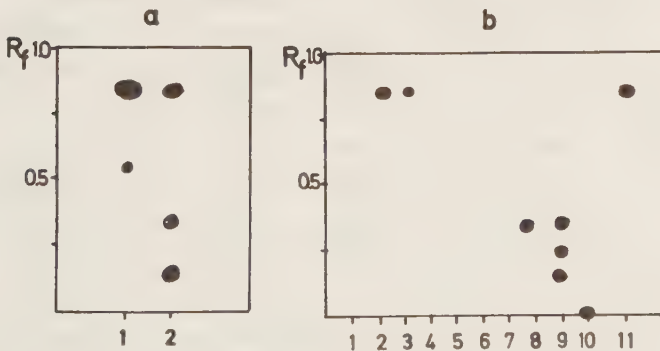


Abb.7 Dünnschichtchromatogramm der Säurefraktion II im Vergleich zu Abscisinsäuremethylester (ABA-E): 7a: ABA-E (1) und Säurefraktion II (2). 7b: Die Fraktionen der Kieselgeltrennung (1-10) und ABA-E (11). Dünnschichtplatten Fa Merck Nr. 5729 mit Fluoreszenzindikator. Fließmittel: Hexan-Essigester 15:85.

In den Fraktionen 2 und 3 der Kieselgeltrennung ist Abscisinsäure enthalten. Um zu überprüfen, ob die anderen Fraktionen noch weitere Keimungshemmstoffe enthalten, wurde ein Keimungshemmtest an allen Fraktionen durchgeführt. Keine der anderen Fraktionen wies jedoch eine Bioaktivität auf. Die unterschiedliche Bioaktivität an *Amaranthus caudatus* in Säure- und Ester-

form muß auf die unterschiedliche Aktivität der Abscisinsäure und des Abscisinsäuremethylesters zurückzuführen sein. Es wurden zunächst die Fraktionen 2 und 3 vereinigt, der Gehalt an Abscisinsäure als Abscisinsäuremethylester gaschromatographisch bestimmt und ein Keimungshemmtest durchgeführt.

Tab.7: Vergleich der Keimungshemmung der Säurefraktion II (S 2) mit synthetischer Abscisinsäure (ABA) und Abscisinsäuremethylester (ABA-E). Die Säurefraktion II liegt verestert als Methylester vor.

Konzentration an ABA [Mol/l]	% Keimungshemmung				
	Amaranthus caudatus			Lepidium sativum	
	S 2	ABA	ABA-E	ABA	ABA-E
1,0 x 10 ⁻⁵	100	81	100	100	100
1,0 x 10 ⁻⁶	99	6	99	81	100
5,0 x 10 ⁻⁷	87	5	96	49	95
1,0 x 10 ⁻⁷	24	—	8	10	25

Tab.7 zeigt den Vergleich der Keimungshemmung der aufgereinigten Säurefraktion II mit Abscisinsäure und Abscisinsäuremethylester an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum*. An *Amaranthus caudatus* wird durch die Veresterung ein deutlicher Anstieg in der Keimungshemmung erzielt. Die Keimungshemmung entspricht der Säurefraktion II. Im Vergleich dazu ist der Anstieg der Keimungshemmung an *Lepidium sativum* gering. Dies stimmt mit dem Ergebnis in Tab.6 überein, daß durch Veresterung keine Steigerung der Bioaktivität an *Lepidium sativum* erzielt wird. Dieses Ergebnis zeigt auch, daß keine weitere Keimungshemmung in der Säurefraktion vorhanden ist.

Es galt nun die Frage abzuklären, welchen Beitrag die isolierten Keimungshemmstoffe zur Keimungshemmung beitragen, denn der Gehalt und die

Aktivität unterscheiden sich bei den identifizierten Stoffen . Dazu wurden die Keimungshemmstoffe quantitativ bestimmt.

3. Quantitative Bestimmung der Keimungshemmstoffe aus *Sorbus aucuparia*

3.1 Bestimmung der Parasorbinsäure in Früchten und Samen

Da die Parasorbinsäure in der Neutralfraktion und in der Säurefraktion nachgewiesen wurde, mußte eine quantitative Analyse durchgeführt werden, bei der man den gesamten Anteil an Parasorbinsäure erfaßt. Deshalb wurde eine quantitative Bestimmungsmethode entwickelt, bei der die Parasorbinsäure auf einfache Weise direkt aus dem Rohextrakt bestimmt werden kann. Die Bestimmung erfolgt mittels HPLC (siehe III.A.4.1.).

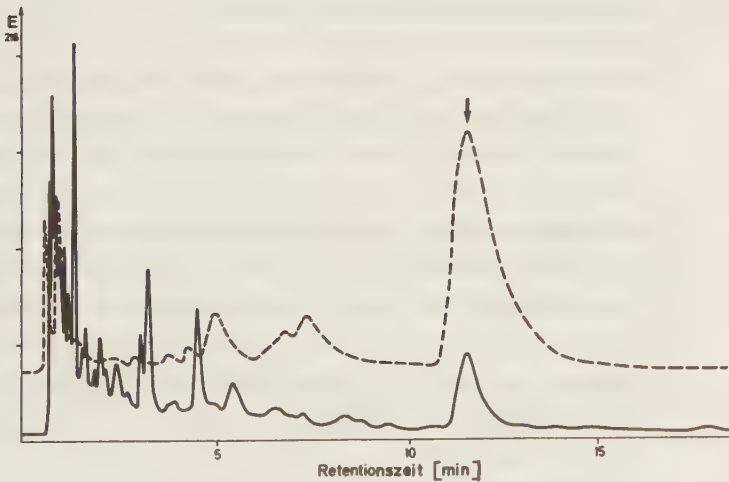


Abb.8: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von Früchten (---) und Samen (—) von *Sorbus aucuparia*. Detektion bei 213 nm. Säule RP-8. Alle weiteren Bedingungen siehe III.A.4.1.1. Die Retentionszeit der Parasorbinsäure (Pfeil) beträgt 11,5 min.

In Abb.8 ist das HPLC-Chromatogramm der Parasorbinsäurebestimmung in Früchten (gestrichelte Linie) und Samen (durchgezogene Linie) dargestellt. Der Gehalt wurde im Vergleich zu authentischer Parasorbinsäure bestimmt und liegt bei 4-7 mg/g Frischgewicht für die Früchte. Es sind Untersuchungen über den Gehalt an Parasorbinsäure im Verlauf des Reifungsprozesses beschrieben (Diemair und Franzen 1959), die mit einem maximalen Gehalt von 2mg/g Frischgewicht wesentlich niedriger sind als die mittels HPLC bestimmten Werte. Dies liegt möglicherweise daran, daß die Parasorbinsäure unvollständig extrahiert wurde. Für die Samen wurde ein Gehalt von 0,1 mg/g Samen bestimmt. Es sind also nur 1,8 % der gesamten Menge an Parasorbinsäure im Samen nachzuweisen. Der Vergleich zu ABA erfolgt in Tab.8.

3.2 Bestimmung der Isopropyläpfelsäure in Früchten

Für die Bestimmung der Isopropyläpfelsäure wurde die Aufarbeitung, wie bei der Isolierung beschrieben, bis einschließlich der Destillation durchgeführt. Die quantitative Bestimmung erfolgte mittels Gaschromatographie als Isopropyläpfelsäuredimethylester. Als Standard diente synthetischer Isopropyläpfelsäuredimethylester (III.A.3.2). Der Gehalt an Isopropyläpfelsäure wurde mit 1,0 - 1,5 µg/g Frischgewicht bestimmt; das ist drei Zehnerpotenzen niedriger als der der ABA. Die spezifische Bioaktivität an *Amaranthus caudatus* (siehe Tab.5 Seite 53) ist deutlich niedriger als die von ABA. Isopropyläpfelsäure sollte also nur eine untergeordnete Rolle bei der Keimungshemmung von *Sorbus aucuparia* spielen.

3.3 Bestimmung der Abscisinsäure in Früchten, Fruchtfleisch und Samen

Der Gehalt an Abscisinsäure wurde gaschromatographisch, wie unter III.A.4.3 beschrieben, bestimmt. Die Früchte (Ernte 1986) enthalten 1,3-2,5 µg/g Frischgewicht. Die getrennte Untersuchung von Fruchtfleisch und Samen (Ernte 1987) ergab für das Fruchtfleisch einen Gehalt von 2,1 µg/g Frisch-

gewicht Fruchtfleisch und 0,27 µg/g Samen. Der Gehalt in den Samen entspricht 11,4 % der Gesamtmenge an Abscisinsäure.

4. Vergleich des Gehaltes von Parasorbinsäure und Abscisinsäure im Samen von Sorbus aucuparia mit den exogen benötigten Mengen bei Amaranthus caudatus, Lepidium sativum und Avena sativa

Um eine Aussage über die mögliche Wirksamkeit der Keimungshemmstoffe Parasorbinsäure und ABA machen zu können, wurde der bestimmte Gehalt auf Mol/Samen umgerechnet und mit den exogen benötigten Mengen an Amaranthus caudatus, Lepidium sativum und Avena sativa verglichen.

Parasorbinsäure kommt im wesentlichen als Glykosid in den Früchten vor und zeigt in dieser Form keine hohe Aktivität. Es existiert daneben auch die freie Form. Denkbar wäre, daß in den Samen ausschließlich die freie Parasorbinsäure vorhanden ist. Deshalb wurde bei der Berechnung für Parasorbinsäure der Maximalwert von 0,1 mg/g Samen angenommen und mit dem Wert für ABA verglichen.

Tab.8: Vergleich der Mol/Samen an Parasorbinsäure und Abscisinsäure für eine 50%ige Keimungshemmung an Amaranthus caudatus (a), Lepidium sativum (b), Avena sativa (c) mit dem Gehalt in Mol/Samen in Sorbus aucuparia (d).

	Konzentration [Mol / Samen] x 10 ⁻⁹ für 50 % Keimungshemmung			
	a	b	c	d
Parasorbinsäure	15,6	44	17,2	4,5
Abscisinsäure	0,25	0,023	0,25	0,005

Tab.8 zeigt den Vergleich der Konzentrationen, die benötigt werden um eine

50%ige Keimungshemmung von Parasorbinsäure und ABA an verschiedenen Samen (a - c) hervorzurufen. Dazu ist der Gehalt von Parasorbinsäure und ABA im *Sorbus aucuparia* Samen dargestellt. Parasorbinsäure wirkt an *Amaranthus caudatus* stärker als an *Lepidium sativum* und *Avena sativa*. In den Samen von *Sorbus aucuparia* ist jedoch nur ca. ein Drittel der Menge, die bei *Amaranthus caudatus* benötigt wird, enthalten. ABA wirkt an *Lepidium sativum* am stärksten. Im *Sorbus aucuparia* Samen ist jedoch nur ein Fünftel der Menge vorhanden, die bei *Lepidium sativum* eine 50%ige Keimungshemmung bewirkt.

Dieses Ergebnis läßt folgende Schlußfolgerungen zu:

1. Wenn der Samen von *Sorbus aucuparia* nicht wesentlich empfindlicher auf Parasorbinsäure oder ABA reagiert, bewirkt keine der beiden Verbindungen allein die Keimungshemmung.
2. Synergistische Effekte können ausgeschlossen werden, da durch gleichzeitige Gabe von ABA und Parasorbinsäure keine Steigerung der Keimungshemmung im Vergleich zu den Einzelsubstanzen erzielt werden konnte.
3. Bei der Bestimmung der Keimungshemmung an Samenmaterialien setzt man die Substanzen exogen zu, ohne eine Aussage darüber machen zu können, wieviel wirklich von den Samen aufgenommen wird. Es könnte also sein, daß nur ein minimaler Anteil tatsächlich an den Wirkort gelangt. Für *Sorbus* könnte dies bedeuten, daß der bestimmte Gehalt an ABA bzw. Parasorbinsäure die tatsächlich biologisch wirksame Menge ist.

Zu Punkt 3 wurde das folgende Experiment durchgeführt:

5. Untersuchungen über die Aufnahme von exogen zugesetzter Abscisinsäure bei *Amaranthus caudatus*

Es wurden 40 Petrischalen mit je 25 *Amaranthus caudatus* Samen mit jeweils 1 ml einer 10^{-4} Mol/l Abscisinsäurelösung versetzt und wie bei jedem angesetzten Biotest 48 Stunden bei 28°C im Dunkeln inkubiert (siehe III.C.1.1). Die Samen wurden aufgearbeitet, wie unter III.A.5 beschrieben, und der Gehalt an Abscisinsäure bestimmt. Es wurde ein Wert von $5,1 \times 10^{-10}$ Mol

bestimmt. Da 1000 Samen eingesetzt waren, entspricht das einem Gehalt von $5,1 \times 10^{-13}$ Mol/Samen. Diese Menge genügt jedoch, um an *Amaranthus caudatus* eine 100% ige Keimungshemmung zu erzeugen. Die Samen von *Sorbus aucuparia* enthalten 5×10^{-12} Mol/Samen an Abscisinsäure. Das ist das Zehnfache der Menge, die bei *Amaranthus caudatus* für eine Totalhemmung benötigt wird. Geht man von gleicher Wirkungsweise der Abscisinsäure in den unterschiedlichen Samenmaterialien aus, so sollte der Gehalt an ABA schon allein genügen, um eine Keimungshemmung an *Sorbus aucuparia* Samen zu erzeugen.

6. Diskussion der Ergebnisse

6.1 Isolierung von Keimungshemmstoffen aus *Sorbus aucuparia*

In der Literatur werden Isolierungen von Keimungs- und Wachstumshemmstoffen an den unterschiedlichsten Samenmaterialien durchgeführt. Es werden u.a. Samen von Kresse (Bolte et al, 1984; Shimomura et al., 1983), Reis (Fukui et al, 1977a; Fukui et al., 1977b), Sojabohne (Spencer et al, 1984) und Salat (Hirota et al, 1985) verwendet. Die Samen, die zur Isolierung verwendet werden, müssen eine hohe Keimrate besitzen, damit die Keimungshemmung deutlich erkennbar gegenüber dem Wasserwert ist. In unserem Labor wurde bisher *Amaranthus caudatus* zur Isolierung der Keimungshemmstoffe eingesetzt.

Bei der Isolierung der Keimungshemmstoffe aus *Sorbus aucuparia* wurden zum ersten Mal zwei verschiedene Samenmaterialien (*Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum*) nebeneinander verwendet. Die Ergebnisse (siehe IV.A.2.3.1) zeigen, daß dies notwendig ist, da sonst Stoffe, die Keimungshemmung bei nur einer Species bewirken, leicht übersehen werden können.

6.2 Isolierte Keimungshemmstoffe aus *Sorbus aucuparia*

Es konnten drei Keimungshemmstoffe aus *Sorbus aucuparia* isoliert und identifiziert werden.

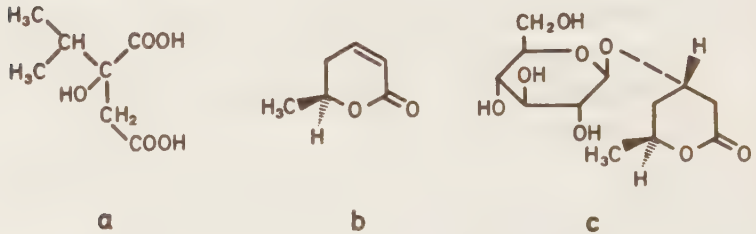


Abb.9 Strukturen von Keimungshemmstoffen aus *Sorbus aucuparia* (a) Isopropyläpfelsäure, (b) Parasorbinsäure und (c) Parasorbosid.

Abb.9 zeigt die Strukturen der Isopropyläpfelsäure (a), der Parasorbinsäure (b) und des Parasorbosids (c). Die Form des Parasorbosids liegt im wesentlichen in den Samen vor (Tscheche et al, 1971). Als weiterer Keimungshemmstoff wurde Abscisinsäure nachgewiesen (nicht abgebildet). Die isolierten Keimungshemmstoffe zeigen, daß strukturell unterschiedlichste Verbindungen Keimungshemmung bewirken können. Es ist zu erwarten, daß diese Verbindungen im Stoffwechsel der Samen an verschiedenen Stellen eingreifen.

6.2.1 Isopropyläpfelsäure

Isopropyläpfelsäure wurde bisher noch nicht als Keimungshemmstoff beschrieben. Sie ist ein Zwischenprodukt der Leucin-Biosynthese (Richter, 1982). Leucin gehört zu den essentiellen Aminosäuren, die von Pflanzen synthetisiert werden können. Isopropyläpfelsäure sollte also in allen Pflanzen nachzuweisen sein. Nachgewiesen wurde sie in Getreide (Lohaus et al, 1983) und im menschlichen Urin (Spiteller M. und Spiteller G., 1979). Bei der

Chromatographie an Sephadex LH 20 (vgl. Abb.5) wurde sie im Bereich der Fraktionen 30-55 nachgewiesen. Dies ist der Bereich, bei dem der *Amaranthus caudatus* Samen die höchste Keimungshemmung zeigt, während an *Lepidium sativum* kaum Hemmwirkung erzielt wird. *Amaranthus caudatus* reagiert offensichtlich bevorzugt auf einfache Mono-, Di- und Tricarbon-säuren, die in dem Fraktionsbereich 30 bis 55 isoliert werden. Die von Lohaus (1981) aus den Spelzen von *Avena sativa* isolierte Dihydrohämatis-säure gehört ebenfalls dieser Verbindungsklasse an. Die Bedeutung der Isopropyläpfelsäure als Keimungshemmstoff ist noch nicht geklärt, da sie unterschiedlich starke Wirksamkeit an verschiedenen Samen erzeugen kann. Sie trägt einen Anteil zur Keimruhe von *Sorbus aucuparia* bei, jedoch sollte ihr Beitrag wegen des niedrigen Gehaltes von 1-1,5 µg/g Frischgewicht in den Früchten gegenüber den anderen isolierten Keimungshemmstoffen eine untergeordnete Rolle spielen.

6.2.2 Parasorbinsäure

Die Parasorbinsäure (Abb.9 b) ist ein bereits beschriebener Keimungshemmstoff (Kuhn et al., 1943). Die Untersuchungen von Tschache et al (1971) zeigen jedoch, daß sie, bis auf geringe Spuren, als Parasorbosid (Abb.9c) vorliegt. Dieses Glycosid zeigt eine wesentlich geringere Keimungshemmung an Weizen Samen (Wepplo, 1987). Es wäre aber durchaus denkbar, daß die Parasorbinsäure über einen langen Zeitraum aus dem Glycosid freigesetzt wird und im Samen von *Sorbus aucuparia* Keimungshemmung erzeugt. Der bestimmte Gehalt an Parasorbinsäure mit 4-7 mg/g Frischgewicht für die Früchte ist sehr hoch. Dagegen läßt sich in den Samen nur ein geringer Anteil an Parasorbinsäure, nämlich 0,1 mg/g Samen, nachweisen. Wie die Berechnungen in Tab.8 zeigen, spricht *Amaranthus caudatus* 3 mal empfindlicher auf Parasorbinsäure an als *Lepidium sativum*. Wie empfindlich dagegen der Samen von *Sorbus aucuparia* auf Parasorbinsäure reagiert, läßt sich nicht sagen. Möglicherweise reagiert er noch wesentlich empfindlicher als *Amaranthus caudatus*.

6.2.3 Abscisisäure

Abscisisäure ist ein bekannter Keimungshemmstoff , der bisher aus den verschiedensten Samenmaterialien (Allgemeines Strasburger , 1983 und Mohr und Schopfer , 1978) und auch aus Algen (Tietz und Kasprik , 1986) isoliert wurde . Bei dieser Isolierung zeigte sich , daß man die Abscisisäure leicht übersehen kann , wenn man ausschließlich Samen von *Amaranthus caudatus* einsetzt (siehe IV.A.2.3.1) .

Die unterschiedliche Wirksamkeit von Abscisisäure und Abscisisäuremethylester an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* ist auffällig (siehe IV .A.2.3.3.1 Tab.7). Die Keimungshemmung bei *Lepidium sativum* ändert sich unwesentlich , während sie an *Amaranthus caudatus* in der Methylesterform drastisch erhöht wird . Geht man davon aus , daß die Reaktionszentren der Samen gleich sind , kann dieser Effekt nur mit einer verbesserten Aufnahme des Methylesters in die *Amaranthus caudatus* Samen erklärt werden , da sich bei *Lepidium sativum* kaum Unterschiede der Säure- und Esterform ergeben . Die Samenschale von *Amaranthus caudatus* muß die Aufnahme lipophiler Verbindungen begünstigen . Es bedeutet aber auch , daß der Aufnahme in die einzelnen Samen eine größere Bedeutung zukommt als bisher angenommen .

Die Untersuchung über die Aufnahme exogen zugesetzter Abscisisäure bei *Amaranthus caudatus* zeigt , daß nur 0,013% der angebotenen Menge aufgenommen werden (siehe IV.A.5) . Dies sind $5,1 \times 10^{-13}$ Mol / *Amaranthus caudatus* Samen an Abscisisäure . Dieser Gehalt genügt , um eine 100% ige Keimungshemmung zu bewirken . In den Samen von *Sorbus aucuparia* wurden 5×10^{-12} Mol / Samen Abscisisäure bestimmt . Das ist das Zehnfache der Menge , die bei *Amaranthus caudatus* eine 100% ige Keimungshemmung erzeugt . Wenn sich die Samen physiologisch in ihren Reaktionzentren im Bezug auf Abscisisäure nicht wesentlich unterscheiden , genügt dieser Gehalt , um die Keimungshemmung an *Sorbus aucuparia* zu bewirken .

Der wirkliche Beweis der Wirksamkeit der isolierten Keimungshemmstoffe im Samen von *Sorbus aucuparia* gelingt nur durch Gabe dieser Substanzen zu

Keimrate der Samen nicht durchführbar.

Abschließend läßt sich feststellen, daß sicherlich alle drei isolierten Keimungshemmstoffe einen Beitrag zur Keimruhe bei *Sorbus aucuparia* liefern, wobei der Anteil der Abscisinsäure wahrscheinlich der höchste ist.

B. Keimungshemmstoffe aus *Thuja occidentalis*

1. Einleitung

Thuja occidentalis ist ein Beispiel für ein Pflanzenmaterial mit allelopathischen Wirkungen. Man beobachtet, daß in unmittelbarer Umgebung Samen anderer Pflanzen schlecht auskeimen und Pflanzen in ihrer Entwicklung zurück bleiben. Es ist also zu vermuten, daß *Thuja occidentalis* Stoffe an die Umgebung abgibt, die diese Effekte hervorrufen.

Erste Untersuchungen über die mittels Wasserdampfdestillation isolierten Inhaltsstoffe in *Thuja occidentalis* wurden vor ca. 100 Jahren durchgeführt. Wallach (1892) konnte bei seinen Untersuchungen über die Inhaltsstoffe des sogenannten "Thujaöls" die Monoterpene Pinen und Fenchon nachweisen. Eine weitere Verbindung wurde von ihm in großen Mengen aus *Thuja occidentalis* isoliert, die chemisch ähnliche Reaktionen wie Fenchon zeigte und die er Thujon benannte. In der Folgezeit wurden die Monoterpene in *Thuja occidentalis* mittels Gaschromatographie untersucht (Banthorpe et al, 1973). Traud und Musche (1983) bestimmten als Hauptkomponenten Fenchon, Thujon, Campher, Terpinen-4-ol und als Nebekomponenten einige Kohlenwasserstoffe.

Die Zusammensetzung der Monoterpene in *Thuja occidentalis* und ihre keimungshemmende Wirkung wurden von Spraul (1987) in unserem Labor untersucht. Er konnte nachweisen, daß in *Thuja occidentalis* keine Monoterpenalkohole bis auf Spuren von Thymol anwesend sind. Die Alkohole entstehen erst durch Umlagerung von ungesättigten Kohlenwasserstoffen und Wasseranlagerung und sind somit Aufarbeitungsartefakte. Die keimungshemmende Wirkung der Monoterpene an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* konnte er nach Substanzklassen einordnen. Es ergibt sich annähernd folgende Abstufung bei der Keimungshemmung:

Alkohole > Ketone > Acetate, Kohlenwasserstoffe

Lohaus (1985) untersuchte den wässrigen Extrakt von *Thuja occidentalis*, der wie bei *Sorbus aucuparia* hergestellt wurde. Die anschließende Extraktion mit Ether ergab eine Neutral- und eine Säurefraktion. Sie untersuchte die Säurefraktion und konnte zwei Keimungshemmbereiche nachweisen. Der zweite Bereich beinhaltete 40% der keimungshemmenden Wirkung und bestand aus Abscisinsäure.

Der erste Keimungshemmbereich enthält ein Isomerengemisch aus 4 Isomeren.

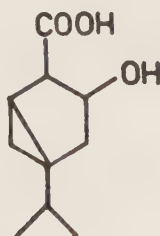


Abb.10: Eine der isomeren Verbindungen nach dem Strukturvorschlag von Lohaus (1985).

Die isomeren Verbindungen sollten eine dem Thujangerüst ähnliche Struktur besitzen, die als funktionelle Gruppen eine Alkohol- und eine Carboxylgruppe tragen. Die Stellung der einzelnen Gruppen war nicht abschließend bewiesen, da sich die Isomeren nicht voneinander trennen ließen.

Bei der Isolierung von Lohaus wurde das Pflanzenmaterial 24 Stunden unter Rückfluß gekocht, wobei eine Isomerisierung leicht eintreten kann. Es sollte jetzt eine Isolierungsmethode unter Vermeidung von Isomerisierungs-Reaktionen entwickelt werden und, wenn möglich, die Struktur der dann isolierten Verbindung aufgeklärt werden.

2. Isolierung von Keimungshemmstoffen aus *Thuja occidentalis*

2.1 Extraktion

Bei der gesamten Isolierung sollte die Raumtemperatur nicht überschritten werden, um eine Isomerisierung durch erhöhte Temperatur zu vermeiden. Für die Extraktion mußte darum ein anderes Extraktionsmittel als bei der Isolierung von Lohaus (1985) gewählt werden. Vorversuche mit Lösungsmitteln verschiedener Polarität (Methanol, Aceton) ergaben eine Keimungshemmung in der gleichen Größenordnung wie die von Lohaus erzielten Werte bei der Extraktion mit Wasser. Es wurde Methanol als Extraktionsmittel gewählt, da es in der Polaritätsreihe dem Wasser näher steht als Aceton. Es sollte also zu erwarten sein, daß die gesuchte Verbindung eher mit Methanol als mit Aceton extrahiert wird.

Der Rohextrakt wurde auf ein Drittel des Volumens eingengt und dann mit Lösungsmitteln steigender Polarität ausgeschüttelt. Zunächst wurde mit Hexan extrahiert und anschließend der methanolische Rückstand mit etwas Wasser verdünnt, um die Polarität zu erhöhen. Bei der nachfolgenden Extraktion mit Methylenchlorid erwies es sich als günstig den pH auf 5 zu erniedrigen, weil dadurch eine bessere Phasentrennung erzielt werden konnte. Der Rückstand wurde mit Essigester extrahiert. Von allen Extrakten und dem Rückstand wurde ein Keimungshemmtest an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* durchgeführt (siehe III.B.1.1, III.B.1.2, III.B.1.3, III.B.1.4, III.C.1.1 und III.C.2.1).

2.1.1 Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus*

Abb.11 zeigt den Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* des Rohextraktes mit den einzelnen Phasen unterschiedlicher Polarität. Aufgetragen wurden die Prozent Keimungshemmung gegen die Konzentration des Ausgangsvolumens. In der Essigester-Phase ist bei der 0,5 fachen Konzentration des Ausgangsvolumens keine Keimungshemmung mehr enthalten (nicht

abgebildet). Der Rohextrakt (gestrichelte Linie) zeigt eine Keimungshemmung bis zur 0,01 fachen Konzentration des Ausgangsvolumens. Die Keimungshemmung verteilt sich auf die Methylenchlorid-Phase (strichpunktierte Linie) und die Hexan-Phase (durchgezogene Linie). Der Rückstand (punktierte Linie) enthält noch eine Restaktivität.

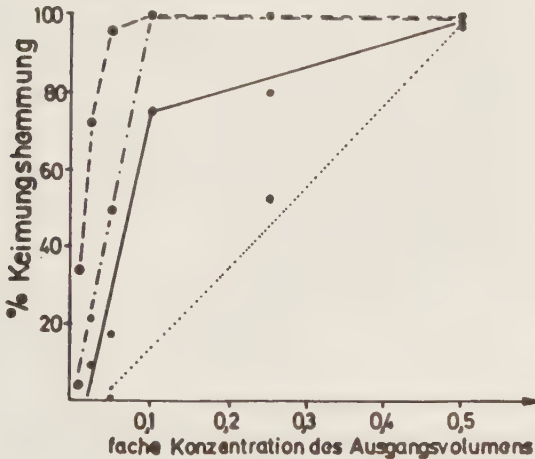


Abb.11 : Keimungshemmung des Methanolextraktes aus *Thuja occidentalis* an *Amaranthus caudatus*. Rohextrakt (----) ; Hexan-Phase (—) ; Methylenchlorid-Phase (- · - · -) und Rückstand (.....).

2.1.2 Vergleich der Keimungshemmung an *Lepidium sativum*

Abb.12 zeigt den Vergleich der Keimungshemmung des Rohextraktes mit den einzelnen Extraktionsphasen an *Lepidium sativum*. Aufgetragen wurde die Keimungshemmung in Prozent in Abhängigkeit von der Konzentration des Ausgangsvolumens. Die Hexan-Phase zeigt an *Lepidium sativum* keine Keimungshemmung. Der Hauptanteil der keimungshemmenden Wirkung wird in die Methylenchlorid-Phase (strichpunktierte Linie) extrahiert. Die Essigester-Phase (strichdreifachpunktierte Linie) und der Rückstand (durchgezogene Linie)

Linie) enthalten, an diesem Samenmaterial getestet, eine Restaktivität. Offensichtlich zeigen die eingesetzten Samenmaterialien deutliche Unterschiede im Verhalten gegenüber den einzelnen Extraktionsphasen.

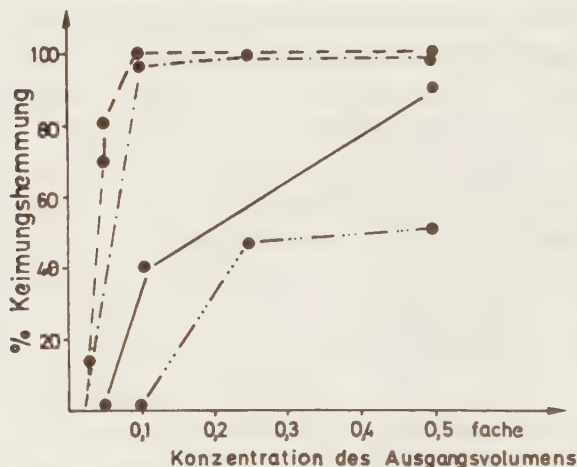


Abb.12 : Keimungshemmung des Methanolextraktes aus *Thuja occidentalis* an *Lepidium sativum*. Rohextrakt (----); Methylenchlorid-Phase (- · - · -); Essigester-Phase (- · · · -) und Rückstand (—).

2.1.3 Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum*

Um diese Unterschiede zu verdeutlichen, wurden die Samenmaterialien miteinander verglichen.

In Abb.13 ist der Vergleich der Keimungshemmung der beiden Samenmaterialien *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* bei der 0,1 fachen Konzentration des Ausgangsvolumens dargestellt. Die Hexan-Phase zeigt bei dieser Konzentration an *Amaranthus caudatus* (2a) eine Keimungshemmung von 75%, während an *Lepidium sativum* (2b) keine Keimungshemmung mehr nachzuweisen ist. Dies bedeutet, daß die in der Hexan-Phase enthaltenen Stoffe an *Amaranthus caudatus* entweder eine wesentlich größere oder an

Lepidium sativum keine Wirksamkeit besitzen. In der Methylenchlorid-Phase (3a und 3b) und im Rückstand (5a und 5b) ist das Verhalten der beiden Samen ähnlich. Dieses Ergebnis läßt 3 Interpretationen zu, die bereits bei *Sorbus aucuparia* ausgeführt wurden (siehe IV.A.2.1.3). Es kann eine Verbindung vorliegen, die bei beiden Samen die gleiche Bioaktivität besitzt. Es können zwei Substanzen vorhanden sein, die jeweils an einem Samen aktiv sind und eine zufällige Übereinstimmung ergeben. Bei der dritten Möglichkeit liegt ein Substanzgemisch vor, das bei beiden Samen zufällig die gleiche Keimungshemmung bewirkt. In der Essigester-Phase (4a und 4b) ist an beiden Samenmaterialien keine Keimungshemmung mehr nachzuweisen.

In der Hexan-Phase ist die gesuchte Verbindung nicht zu erwarten, da von einer gewissen Polarität dieser Verbindung ausgegangen werden muß. Die Aufarbeitung der Hexan-Phase diente lediglich der Kontrolle, ob ausschließlich die vermuteten Monoterpene enthalten sind.

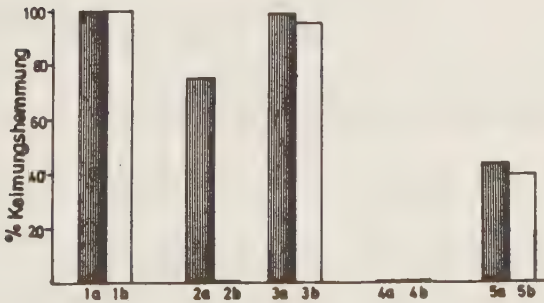


Abb.13: Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* (a) und *Lepidium sativum* (b) bei der 0,1 fachen Konzentration des Ausgangsvolumens. Rohextrakt (Nr.1); Hexan-Phase (Nr.2); Methylenchlorid-Phase (Nr.3); Essigester-Phase (Nr.4) und Rückstand (Nr.5).

2.2 Aufarbeitung der Hexan-Phase

Hexan ist ein sehr unpolares Lösungsmittel, daher sind in dieser Fraktion unpolare Verbindungen zu erwarten. Hexan war gewählt worden, um die in Thuja vorhandenen Monoterpene zu einem großen Teil abzutrennen. Die Monoterpene aus Thuja wurden zur selben Zeit von Spraul (1987) in unserem Labor untersucht. Er extrahierte mit unterschiedlichen Methoden und fand eine durchschnittliche, prozentuale Zusammensetzung der Monoterpene in *Thuja occidentalis* von:

α -Thujon 63%, Fenchon 11,9%, β -Thujon 7,7%, Sabinen 6,8%, Bornylacetat 3,9%, α -Pinen 1,8%, Campher 1,6%, Camphen 1,5%, Myrcen 1,3%, Limonen 1,2% und Terpinylacetat mit 0,6 %.

Es wurde kontrolliert, ob in der Hexan-Phase keine anderen Verbindungen enthalten sind. Zunächst wurde durch eine Chromatographie an Sephadex LH 20 weiter aufgereinigt (siehe III.B.1.2) und anschließend die Fraktionen mit Keimungshemmung mittels GC-MS analysiert. In den vereinigten Fraktionen, die Keimungshemmung zeigten, ließen sich die Monoterpene α -Thujon, β -Thujon, Fenchon und Campher nachweisen. Die Monoterpene zeichnen sich durch große Flüchtigkeit aus, wobei sich die Flüchtigkeit innerhalb der Substanzklasse folgendermaßen einreihen läßt:

Kohlenwasserstoffe > Ketone > Alkohole > Acetate

Durch das Einengen des methanolischen Extraktes (siehe IV.B.2.1 und III.B.1.1) auf ein Drittel des Gesamtvolumens werden die Monoterpenkohlenwasserstoffe wegen der großen Flüchtigkeit entfernt. Die Monoterpenketone sind in großen Mengen in *Thuja occidentalis* vorhanden, weniger flüchtig als die Kohlenwasserstoffe und werden deshalb beim Einengen des Methanols nicht vollständig am Rotationsverdampfer abgezogen.

2.3 Aufarbeitung der Methylenchlorid-Phase

Vor der Extraktion mit Methylenchlorid wird mit Wasser die Polarität des Methanol-Extraktes erhöht. Reste der Monoterpenketone, die in reinem Methanol noch löslich waren und nicht vollständig in die Hexan-Phase überführt wurden, werden nun schlechter in der Methanol-Wasser-Phase gelöst und können so erschöpfend extrahiert werden. Zusätzlich sind bei dieser Extraktion weitere, etwas polarere Verbindungen zu erwarten, da Methylenchlorid polarer als Hexan ist. Die von Lohaus (1985) gesuchte Verbindung enthält als funktionelle Gruppe eine Carboxylgruppe. Carbonsäuren sind allgemein in Methylenchlorid gut löslich. Deshalb könnte diese Substanz mit diesem Lösungsmittel extrahiert werden. Es wurde als nächster Aufreinigungsschritt eine Chromatographie an Kieselgel Si 60 angeschlossen, um die eventuell vorhandenen Monoterpenketone von den polareren Verbindungen abzutrennen.

2.3.1 Chromatographie an Kieselgel Si 60

Für die Chromatographie an Kieselgel Si 60 wurde ein Stufengradient gewählt, der von Hexan über Hexan-Essigester 50 : 50, Essigester, Aceton bis Methanol reicht. Die Hexan-Essigester-Mischung wurde in zwei Fraktionen unterteilt (siehe III.B.1.3.1). Die erste dieser Fraktionen umfaßte 300 ml und war farblos. Die zweite Fraktion dieser Mischung enthielt 500 ml und war dunkelgrün gefärbt. Von allen Fraktionen wurde ein Keimungshemmtest an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* durchgeführt. In der Hexan-Fraktion wie auch in der ersten Hexan-Essigester-Fraktion konnte keine Keimungshemmung an einem der Samenmaterialien nachgewiesen werden. In den weiteren Ausführungen ist mit Hexan-Essigester-Fraktion immer die zweite Fraktion gemeint.

2.3.1.1 Vergleich der Keimungshemmung der einzelnen Fraktionen an *Amaranthus caudatus* mit der Methylenchlorid-Phase

Da wie oben ausgeführt die Hexan-Phase und die erste Fraktion der Hexan-Essigester 50 : 50 Mischung keine Keimungshemmung zeigten, sind sie in Tabelle 9 nicht berücksichtigt (siehe III.C.1.1).

Tab.9 zeigt den Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* der Methylenchlorid-Phase (a) mit den einzelnen Fraktionen der Chromatographie an Kieselgel Si 60 (b-e). Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, treten bei der Chromatographie an Kieselgel Si 60 fast keine Verluste an Keimungshemmung auf. Die keimungshemmenden Verbindungen sind nahezu vollständig in der Hexan-Essigester-Fraktion (b) enthalten. In den anderen Fraktionen (c-e) sind noch Restaktivitäten vorhanden.

Tab.9: Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus*. Vergleich von Methylenchlorid-Phase (a) und den Fraktionen der Chromatographie an Kieselgel Si 60. Die Fraktionen sind Hexan-Essigester-Fraktion (b), Essigester-Fraktion (c), Aceton-Fraktion (d) und Methanol-Fraktion (e).

Konzentration des		% Keimungshemmung				
Ausgangsvolumens		a	b	c	d	e
1,0	fach	100	100	96	61	59
0,5	fach	100	100	57	41	37
0,25	fach	100	100	27	—	20
0,1	fach	99	99	18	—	—
0,05	fach	49	68	—	—	—
0,025	fach	21	26	—	—	—

2.3.1.2 Vergleich der Keimungshemmung der einzelnen Fraktionen an *Lepidium sativum* mit der Methylenchlorid-Phase

In den Fraktionen Hexan und Hexan-Essigester (erste Fraktion) konnte keine Keimungshemmwirkung nachgewiesen werden. Sie sind in der folgenden Tabelle nicht berücksichtigt (siehe III.C.2.1).

Tab.10 zeigt den Vergleich der Keimungshemmung an *Lepidium sativum* der Methylenchlorid-Phase (a) mit der Hexan-Essigester-Fraktion (b), der Essigester-Fraktion (c), der Aceton-Fraktion (d) und der Methanol-Fraktion (e). Die keimungshemmende Wirkung verteilt sich bei *Lepidium sativum* relativ gleichmäßig auf die vier Fraktionen.

Tab.10: Keimungshemmung an *Lepidium sativum*. Vergleich von Methylenchlorid-Phase (a) und einzelnen Fraktionen der Chromatographie an Kieselgel Si 60. Die Fraktionen sind Hexan-Essigester-Fraktion (b), Essigester-Fraktion (c), Aceton-Fraktion (d) und Methanol-Fraktion (e).

Konzentration des Ausgangsvolumens	% Keimungshemmung				
	a	b	c	d	e
0,5 fach	100	92	71	41	41
0,25 fach	100	42	37	21	21
0,1 fach	76	23	—	—	3
0,05 fach	70	—	—	—	—

2.3.1.3 Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum*

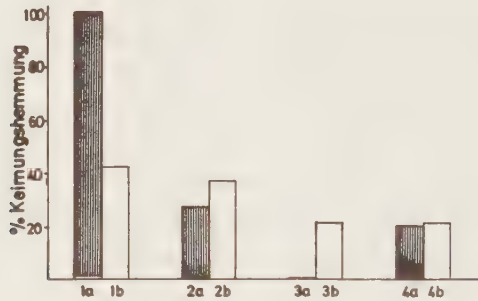


Abb.14 Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* (a) und *Lepidium sativum* (b) bei der 0,25 fachen Konzentration des Ausgangsvolumens. Hexan-Essigester-Fraktion (Nr.1); Essigester-Fraktion (Nr.2); Aceton-Fraktion (Nr.3) und Methanol-Fraktion (Nr.4).

Abb.14 zeigt den Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* bei der 0,25 fachen Konzentration des Ausgangsvolumens. In der Hexan-Essigester-Fraktion ist bei *Amaranthus caudatus* (1a) der Hauptanteil der Keimungshemmung nachzuweisen, während die Hemmwirkung an *Lepidium sativum* (1b) wesentlich niedriger ist. Die Substanzen in dieser Fraktion sind möglicherweise an *Amaranthus caudatus* aktiver, oder es treten zusätzlich Verbindungen in dieser Fraktion auf, die ausschließlich an *Amaranthus caudatus* Keimungshemmung erzeugen. Die anderen Fraktionen zeigen im Vergleich der beiden Samenmaterialien keine drastischen Unterschiede. Für *Lepidium sativum* läßt sich die relativ gleichmäßige Verteilung der Keimungshemmung über die einzelnen Fraktionen (1b, 2b, 3b, 4b) erkennen.

2.3.2 Chromatographie der Hexan-Essigester-Fraktion an Sephadex LH 20

Lohaus (1985) hatte bei der Extraktion mit Wasser zur Aufreinigung eine Chromatographie an Sephadex LH 20 durchgeführt und genau beschrieben, in welchen Fraktionen das gesuchte Isomerengemisch aufzufinden ist. Deshalb wurde die Fraktion mit der höchsten Keimungshemmung (Hexan-Essigester-Fraktion) an Sephadex LH 20 chromatographiert (über Sephadex LH 20 siehe auch IV.A.2.3.1). Es wurde das gesamte Material einer Präparation aufgetragen und ein Stufengradient mit Wasser (bidest), Methanol-Wasser (bidest) 1:1 und Methanol angeschlossen. In den Methanol-Wasser- und Methanol-Fraktionen ließ sich an *Amaranthus caudatus* wie auch an *Lepidium sativum* keine Keimungshemmung nachweisen. Deshalb sind sie im Elutionsdiagramm nicht berücksichtigt (siehe III.B.1.3.2).

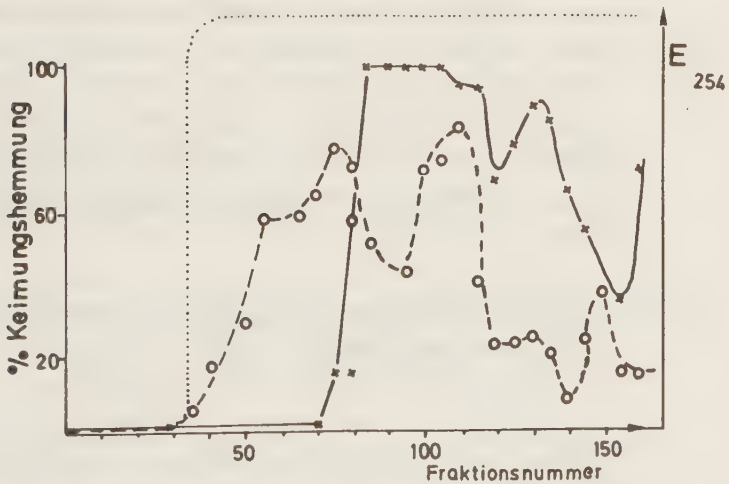


Abb.15: Elutionsdiagramm der Hexan-Essigester-Fraktion aus *Thuja occidentalis* an Sephadex LH 20. Elutionsmittel Wasser. Keimungshemmung der Fraktionen I, II an *Amaranthus caudatus* (----) und *Lepidium sativum* (—). Gemessen wurde außerdem die Extinktion bei 254 nm (.....).

Abb.15 zeigt das Elutionsdiagramm der Hexan-Essigester-Fraktion an Sephadex LH 20. Als Elutionsmittel wurde Wasser (bidest) verwendet. Von jeder fünften Fraktion wurde ein Keimungshemmtest an *Amaranthus caudatus* (100 µl der Fraktion auf 1 ml Testvolumen) und an *Lepidium sativum* (250 µl der Fraktion auf 1,5 ml Testvolumen) angesetzt. Die Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* (gestrichelte Linie) ist über die Fraktionen 50-120 verteilt. Bei *Lepidium sativum* (durchgezogene Linie) läßt sich die Keimungshemmung ebenfalls in einem breiten Bereich (Fraktionen 70-150) nachweisen. Es erfolgt in beiden Fällen keine Auftrennung in zwei Hemmbereiche wie, dies bei *Sorbus aucuparia* (siehe Abb. 5) zu beobachten ist. Die Extinktion bei 254 nm (punktierter Linie) zeigt keinerlei charakteristische Maxima, sodaß sie zur Isolierung der Keimungshemmstoffe ungeeignet ist. Lohaus (1985) hatte die Isomeren der Säurefraktion im Bereich der Fraktionen 45-80 nachgewiesen. Die Keimungshemmbereiche von *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* überlappen im Bereich der Fraktion 80. Unter dem Gesichtspunkt der Isolierung von Lohaus wurden zwei Fraktionen gebildet. Die Fraktion I umfaßte die Fraktionen 50-100 und die Fraktion II die Fraktionen 101 bis 150. Auf die weitere Testung der Keimungshemmung an *Lepidium sativum* wurde verzichtet, da man in diesem Fall eine andere Fraktionierung hätte vornehmen müssen.

2.3.2.1 Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* der Fraktionen I und II mit der Hexan-Essigester-Fraktion

Tab.11 zeigt den Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* (siehe III.C.1.1) der Hexan-Essigester-Fraktion (a) mit den Fraktionen I (b) und II (c). Vergleicht man die Hemmrate der Hexan-Essigester-Fraktion bei der 0,05 fachen Konzentration des Ausgangsvolumens mit der entsprechenden prozentualen Keimungshemmung in den Fraktionen I und II, so ergibt sich für die Fraktion I (bei 0,5 fach), daß ein Zehntel der gesamten Keimungshemmung in dieser Fraktion enthalten ist. Bei der Fraktion II erhält

man die entsprechende Keimungshemmung bei der 0,25 fachen Konzentration, daraus folgt, daß ein Fünftel der Keimungshemmung vorhanden ist. Bei der Chromatographie an Sephadex LH 20 ergeben sich also große Verluste an Keimungshemmung.

Nach Untersuchungen von Spraul (1987) eignet sich Sephadex LH 20 weniger gut zur Chromatographie der Monoterpene. Sie werden sehr stark an Sephadex LH 20 gebunden und lassen sich nur schlecht wieder eluieren.

Ist die gesuchte Verbindung in der Hexan-Essigester-Fraktion enthalten sollte sie im Bereich der Fraktion I vorhanden sein. Deshalb wurde die Fraktion I weiter aufgearbeitet, obwohl sie die geringere Keimungshemmung zeigt.

Tab.11: Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* der Hexan-Essigester-Fraktion (a) mit den Fraktionen I (b) und II (c) (siehe Abb.15).

Konzentration des Ausgangsvolumens	% Keimungshemmung		
	a	b	c
1.0 fach	100	98	100
0,5 fach	100	70	100
0,25 fach	100	46	74
0,1 fach	99	—	48
0,05 fach	68	—	—
0,25 fach	26	—	—

2.4 Extraktion der Fraktion I mit Ether bei pH 8 und pH 1

Die Fraktion I wurde nun bei pH 8 (im weiteren Text als Neutralfraktion bezeichnet) und anschließend bei pH 1 (im weiteren Text als Säurefraktion bezeichnet) ausgeschüttelt. Die Keimungshemmung der Neutral- und Säure-

fraktion an *Amaranthus caudatus* wurde bestimmt und miteinander verglichen .

Tab.12: Vergleich der Keimungshemmung von Neutralfraktion und Säurefraktion an *Amaranthus caudatus* .

Konzentration des		% Keimungshemmung	
Ausgangsvolumens		Neutralfraktion	Säurefraktion
50	fach	100	100
25	fach	100	95
10	fach	100	73
5	fach	100	30
2,5	fach	97	—
1,0	fach	55	—
0,5	fach	25	—

Tab.12 zeigt den Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* der Neutral- und Säurefraktion der Fraktion I der Chromatographie an Sephadex LH 20. Der Hauptanteil der Keimungshemmung wird in der Neutralfraktion nachgewiesen. In der Säurefraktion ist nur eine minimale Restaktivität. Vergleicht man die Neutralfraktion mit der Fraktion I vor dem Ausschütteln mit Ether (siehe Tab.11), so ergibt sich ein Verlust an Keimungshemmung von 50%. An dieser Stelle der Aufarbeitung muß eine relativ große Menge an Ether am Rotationsverdampfer abgezogen werden; sind Monoterpene in der Neutralfraktion, so ließe sich der Verlust wegen der großen Flüchtigkeit der Verbindungen erklären. Da die gesuchten Isomeren in der Säurefraktion enthalten sein sollten, wurde nach Versetzen mit Diazomethan eine GC-MS-Analyse durchgeführt.

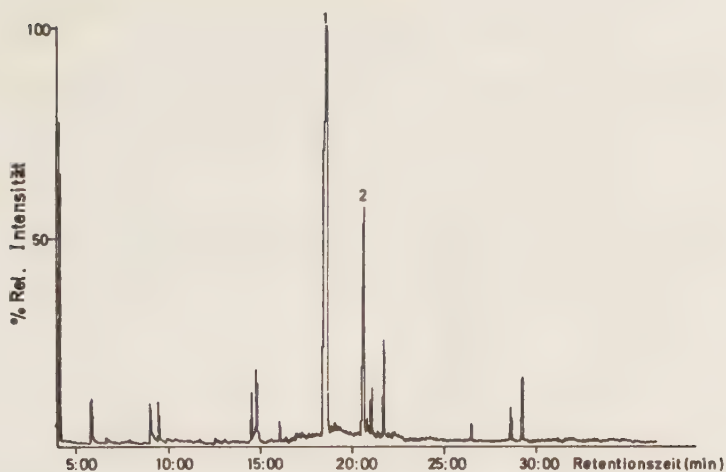


Abb.16 : Gaschromatogramm der GC-MS Analyse der Säurefraktion. Säule: Quarzkapillare SE 54 ; 30 m ; Trägergas Helium (flowrate $2 \text{ cm}^{-3} \text{ min}^{-1}$) ; Injektion : splitlos auf kalte Säule ; Injektortemperatur : 240°C ; Detektion : TIC . (Massenspektren siehe IV.C.3.2).

Abb.16 zeigt das Gaschromatogramm von der mit Diazomethan versetzten Säurefraktion der GC-MS-Analyse. Die Massenspektren zweier der gesuchten Isomeren entsprechen den Verbindungen bei den Retentionszeiten von 18,4 min (1) und 20,7 min (2). Wie dem Gaschromatogramm zu entnehmen ist, sind, bis auf minimale Verunreinigungen aus dem Diazomethan, keine weiteren Verbindungen enthalten. Diese Fraktion wurde für weitere Untersuchungen zur Identifizierung der Verbindungen eingesetzt (siehe IV.B.3.2 und IV.C.3.2.1).

Von der Neutralfraktion wurde ebenfalls eine GC-MS-Analyse durchgeführt, um zu kontrollieren, wie weit Monoterpenketone in dieser Fraktion vorhanden sind.

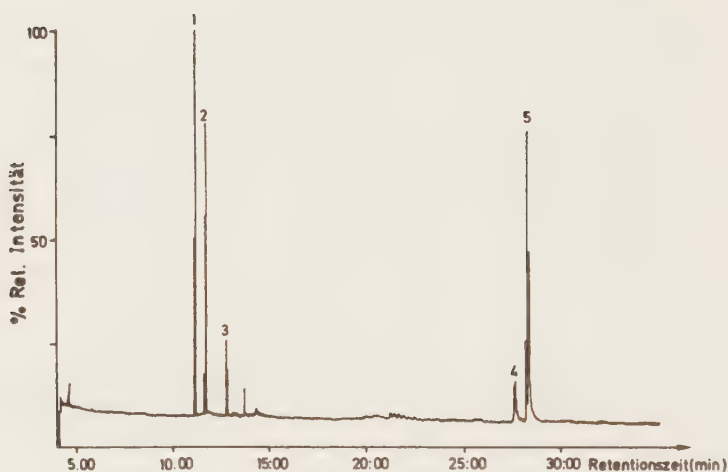


Abb.17: Gaschromatogramm der GC-MS-Analyse der Neutralfraktion. Säule: Quarzkapillare SE 54;30 m Alle weiteren Bedingungen siehe Abb.16. Das Massenspektrum der Verbindung 5 siehe IV.C.3.1.

Abb. 17 zeigt das Gaschromatogramm der GC-MS-Analyse der Neutralfraktion. Es sind fünf Verbindungen enthalten. Drei der Verbindungen (1-3) konnten mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. Es sind dies die Monoterpenketone Fenchon (1), α -Thujon (2) und Campher (3). Die Verbindungen 4 und 5 konnten nicht identifiziert werden. Um zu überprüfen, ob die Keimungshemmung mit den Verbindungen 1-3 im Zusammenhang steht, wurde eine Teilprobe einer Aufarbeitung genommen und die Monoterpenketone am Rotationsverdampfer entfernt.

2.5 Versuche zur weiteren Aufreinigung der Neutralfraktion

2.5.1 Vergleich der Keimungshemmung vor und nach Entfernen der Monoterpene Fenchon, Thujon und Campher

Die Monoterpenketone wurden am Rotationsverdampfer bei 70 ° C Wasserbadtemperatur entfernt und anschließend zur Kontrolle ein Gaschromatogramm angefertigt.

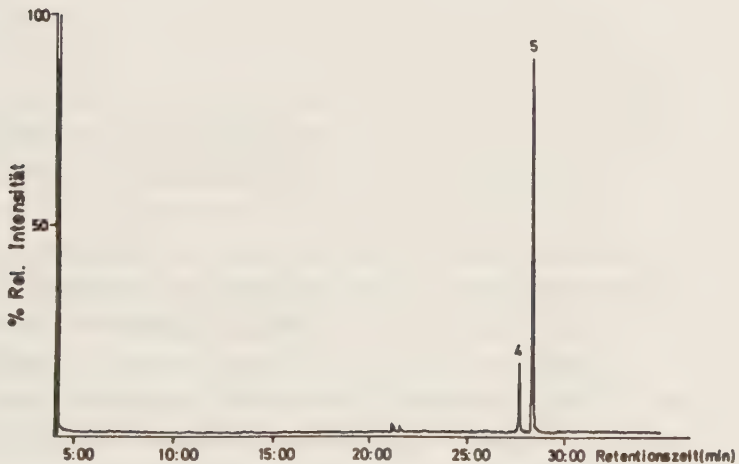


Abb.18: Gaschromatogramm der GC-MS-Analyse der Neutralfraktion nach Entfernen der Monoterpenketone. Säule: Quarzkapillare SE 54 ; 30 m ; alle weiteren Bedingungen siehe Abb.16.

Abb.18 zeigt das Gaschromatogramm der Neutralfraktion nach Entfernen der Monoterpenketone Fenchon, α -Thujon und Campher. Wie aus dem Gaschromatogramm zu entnehmen ist, sind nur noch die Verbindungen 4 und 5 enthalten. Ein Keimungshemmtest an *Amaranthus caudatus* wurde von dieser

Probe angesetzt und mit der Neutralfraktion verglichen.

Tab.13: Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* der Neutralfraktion vor (a) und nach (b) Entfernen der Monoterpenketone

Konzentration des Ausgangsvolumens	% Keimungshemmung	
	a	b
5,0 fach	100	100
2,5 fach	99	86
1,0 fach	12	5

Tab.13 zeigt den Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* vor und nach Entfernen der Monoterpenketone. Die Übereinstimmung der Keimungshemmung liegt im Bereich der Fehlergrenze des Biotestes. Es läßt sich also sagen, daß die Monoterpenketone in dieser Fraktion keinen wesentlichen Beitrag zu Keimungshemmung liefern. Des weiteren läßt sich feststellen, daß die Verbindung 5 die Substanz ist, die wahrscheinlich die Keimungshemmung bewirkt, da sie in der höheren Konzentration vorliegt. (Massenspektrum der Verbindung 5 siehe IV.C.3.1). Spraul (1987) hatte in seiner Diplomarbeit über die "Monoterpene aus *Thuja* als Keimungshemmstoffe" diese Verbindungen beim Extrahieren im Neutralen nicht nachweisen können. Ein Grund dafür könnte sein, daß er mit geringen Mengen an *Thuja occidentalis* gearbeitet (10 g) hat. Im Gegensatz dazu geht diese Präparation von 500 g Ausgangsmaterial aus. Bei dieser Präparation müssen die flüchtigen Monoterpene vollständig entfernt werden, ehe der Nachweis gelingt, daß weitere Verbindungen Keimungshemmung bewirken.

Bei allen weiteren Aufarbeitungen wurden die Monoterpenketone auf die oben beschriebene Weise entfernt.

An dieser Stelle der Aufarbeitung wurde kontrolliert, ob noch weitere, nicht flüchtige Verbindungen in der Fraktion vorhanden sind. Es wurde eine Dünn-

schichtchromatographie durchgeführt .

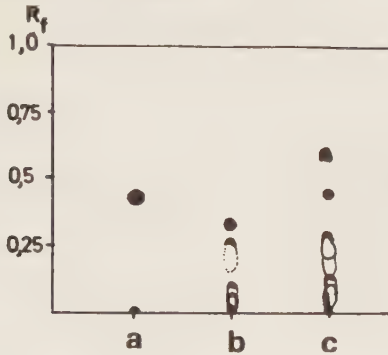


Abb.19 : Dünnschichtchromatogramm der Neutralfraktion nach Entfernen der Monoterpenketone . Dünnschichtplatte Fa Merck Nr 5729 mit Fluoreszenzindikator . Fließmittel : Hexan - Essigester 50 : 50 (a) UV 366 nm ; (b) UV 254 nm ; (c) Anfärben mit Iod .

Abb.19 zeigt das Dünnschichtchromatogramm der Neutralfraktion nach Entfernen der Monoterpene . Es sind mindestens 7 Verbindungen auf dieser Stufe der Aufreinigung enthalten .

Als nächstes galt es abzuklären , ob die keimungshemmende Verbindung überhaupt flüchtig ist , oder ob eine im Gaschromatogramm nicht erkennbare Verbindung die Keimungshemmung hervorruft . Dazu wurde eine Destillation im Hochvakuum durchgeführt .

2.5.2 Destillation der Neutralfraktion im Hochvakuum

Das Material einer Aufarbeitung wurde im Hochvakuum (0,5 Torr) bei 80°C und 120°C destilliert . Anschließend wurde ein Keimungshemmttest an *Amaranthus caudatus* durchgeführt (siehe III.B.1.3.3.1) .

Tab.14 : Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* der Fraktionen der Destillation im Hochvakuum. 80°C - Fraktion (a), 120°C - Fraktion (b) und Rückstand (c)

Konzentration des Ausgangsvolumens	% Keimungshemmung		
	a	b	c
10,0 fach	100	46	14
5,0 fach	100	19	10
2,5 fach	95	14	4
1,0 fach	15	—	—

Tab.14 zeigt den Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* der einzelnen Fraktionen der Destillation im Hochvakuum. Die bei 80°C überdestillierte Fraktion (a) zeigt die Keimungshemmung. In den anderen Fraktion (b und c) sind nur noch Restaktivitäten enthalten. Vergleicht man die 80°C - Fraktion mit den Werten in Tabelle 12 ergibt sich ebenfalls, daß keine Verluste an Keimungshemmung auftreten. Da die Verbindung mit Keimungshemmung flüchtig ist, sollte sie gaschromatographisch nachweisbar sein. Abb.20 zeigt das Gaschromatogramm der 80° C - Fraktion der Destillation im Hochvakuum. Das Gaschromatogramm zeigt neben den Verbindungen 4 und 5 der Neutralfraktion zwei weitere Substanzen. Es läßt sich nicht ausschließen, daß eine der Verbindungen 4 oder 5 bei dem Destillationsschritt zersetzt wird. Die Destillation eignet sich deshalb für die weitere Aufreinigung der Neutralfraktion nicht.

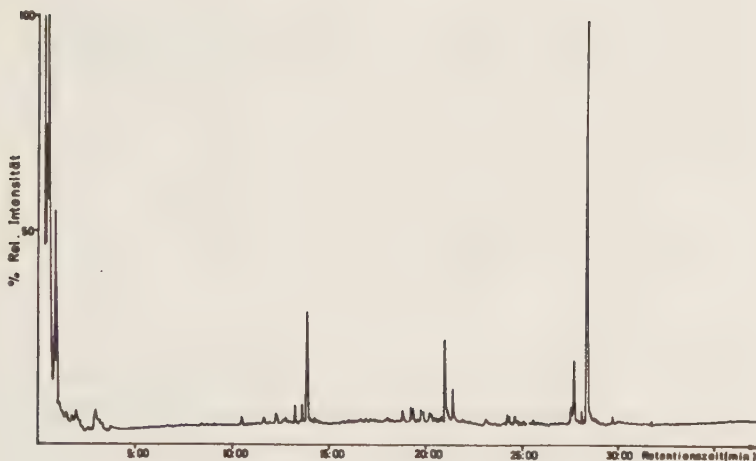


Abb.20 Gaschromatogramm der 80°C-Fraktion der Destillation im Hochvakuum. Säule : Quarzkapillare SE 54; 20 m ; Trägergas : Helium (flow-rate $2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$); Injektor : 240°C; Temperaturprogramm 50°C bis 250°C in 5°C/min; Detektor : FID

Anstatt der Destillation wurde als weiterer Aufreinigungsschritt eine Chromatographie an Kieselgel Si 60 durchgeführt.

2.5.3 Chromatographie der Neutralfraktion an Kieselgel Si 60

Bei der ersten Chromatographie an Kieselgel wurde ein Stufengradient mit großen Polaritätsunterschieden von Fraktion zu Fraktion eingesetzt (siehe III.B.1.3.1). Bei dieser Chromatographie wurde ein flacherer Stufengradient eingesetzt, bei dem sich Substanzen mit geringeren Polaritätsunterschieden trennen lassen (siehe III.B.1.3.3.2). Die Keimungshemmung konnte in den Fraktionen 3 und 4 der Chromatographie an Kieselgel nachgewiesen werden.

Die Fraktionen wurden vereinigt und mittels Dünnschichtchromatographie untersucht.

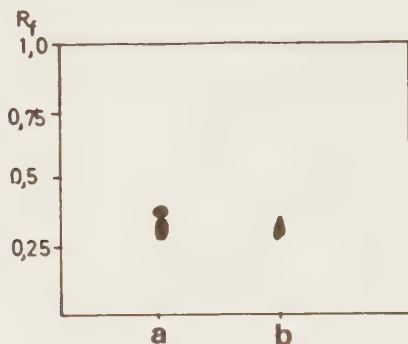


Abb.21: Dünnschichtchromatogramm der vereinigten Fraktionen 3 und 4 der Chromatographie an Kieselgel. (a) UV 254 nm und (b) Anfärbung mit Iod.

In Abb.21 ist das Dünnschichtchromatogramm der vereinigten Fraktionen 3 und 4 der Chromatographie an Kieselgel Si 60 dargestellt. Im UV bei 254 nm (Abb.21a) sind zwei Substanzen zu erkennen, von denen sich eine mit Iod (Abb.21b) anfärben läßt. Im UV bei 366 nm ließ sich keine Verbindung nachweisen. Von dieser Fraktion wurde ein Gaschromatogramm hergestellt. Es ließen sich ausschließlich die Verbindungen 4 und 5 der Neutralfraktion nachweisen. Wenn also die keimungshemmende Wirkung auf eine dieser Verbindungen zurückzuführen ist, ist es wahrscheinlicher, daß die keimungshemmende Wirkung mit der Verbindung 5 im Zusammenhang steht, da sie in höherer Konzentration vorhanden ist.

Um eine Aussage über die Wirksamkeit der Verbindung 5 zu machen, wurde die Konzentration mittels Gaschromatographie im Vergleich zu einem externen Standard bestimmt. Als Standard wurde Abscisinsäuremethylester gewählt, da er sich in der Retentionszeit nur um ca 4 min unterscheidet. In Abhängigkeit zur bestimmten Konzentration wurde ein Keimungshemmtest an *Amaranthus caudatus* angesetzt.

Tab.15: Keimungshemmung der Verbindung **5** der Neutralfraktion an *Amaranthus caudatus* in Abhängigkeit der Konzentration

Konzentration der Verbindung Nr 5 [Mol/l]	% Keimungshemmung
$3,0 \times 10^{-4}$	100
$1,5 \times 10^{-4}$	100
$6,0 \times 10^{-5}$	43
$3,0 \times 10^{-5}$	28

Tab.15 zeigt die Keimungshemmung der Verbindung **5** der Neutralfraktion an *Amaranthus* in Abhängigkeit zur Konzentration (Externer Standard Abscisinsäuremethylester). Die Verbindung zeigt eine Keimungshemmung von 50% bei einer Konzentration von 74,3 μM . Im Vergleich dazu hemmt Abscisinsäure die Keimung an *Amaranthus caudatus* zu 50% bei 9,9 μM . Abscisinsäure ist also 7,5 mal aktiver als die Verbindung der Neutralfraktion. Die Aktivität der Verbindung **5** ist relativ zu anderen bisher isolierten Verbindungen um das Zehnfache höher.

Es sollte zunächst eine weitere Auftrennung der Verbindungen **4** und **5** mittels präparativer Gaschromatographie erfolgen, ehe ein NMR angefertigt wird.

2.6 Extraktion der Fraktion II mit Ether bei pH 8 und pH 1

Die Extraktion und Untersuchung dieser Fraktion diene wie im Fall der Hexan-Phase (siehe IV.B.2.2) ausschließlich der Kontrolle, da in diesem Bereich der Chromatographie an Sephadex LH 20 die gesuchte Verbindung nicht nachgewiesen werden sollte. Die Fraktion II wurde bei pH 8 und pH 1 mit Ether extrahiert und die Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* bestimmt.

Tab.16: Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* der bei (a) pH 8 und (b) pH 1 extrahierten Fraktion II der Chromatographie an Sephadex LH 20

Konzentration des		% Keimungshemmung	
Ausgangsvolumens		a	b
20	fach	100	70
10	fach	96	29
5	fach	67	—
1	fach	46	—

Auch bei dieser Fraktion ergeben sich wie bei der Fraktion I der Chromatographie an Sephadex LH 20 große Verluste an Keimungshemmung im Vergleich zur Fraktion II vor dem Ausschütteln. Da für das Ausschütteln große Mengen Ether benötigt werden, die nachher am Rotationsverdampfer abgezogen werden müssen, erklärt sich der Verlust, wenn flüchtige Verbindungen in der Fraktion enthalten sind. Es ließen sich in der pH 8 Fraktion ebenfalls die Monoterpene α -Thujon, Fenchon und Campher nachweisen. Diesen Effekt der Verschmierung der Monoterpene über einen breiten Bereich bei der Chromatographie an Sephadex LH 20 wurde von Spraul (1987) ebenfalls beobachtet. Die pH 1 Fraktion enthält nur noch eine Restaktivität. Bei dieser Fraktion liegt die Aktivität noch niedriger als bei der pH 1 Extraktion der Fraktion I (siehe IV.B.2.4 Tab.11). Bei der gaschromatographischen Untersuchung konnten nur noch minimale Spuren an Monoterpenen nachgewiesen werden. Bei der Extraktion bei pH 8 wurden die Monoterpene offensichtlich nicht quantitativ extrahiert, sodaß in der pH 1 Fraktion Spuren nachzuweisen sind.

2.7 Isolierung von Abscisinsäure mittels Heißextraktion

Lohaus (1985) hatte bei ihrer Art der Isolierung Abscisinsäure in Thuja

occidentalis nachgewiesen. Jede Fraktion der zuvor aufgeführten Isolierungsmethode wurde auf die Anwesenheit von Abscisinsäure überprüft. Sie konnte jedoch in keiner Fraktion nachgewiesen werden. Daraufhin wurde eine Extraktion durch Kochen mit Wasser durchgeführt, entsprechend der Methode, die unter *Sorbus aucuparia* beschrieben ist (siehe III.A.1 und IV.A.2). Mit Hilfe dieses Isolierungsverfahrens konnte Abscisinsäure in *Thuja occidentalis* nachgewiesen werden. Es wurde ein Gehalt von 1,4 µg/g Frischgewicht bestimmt.

3. Versuche zur Identifizierung der Keimungshemmstoffe aus *Thuja occidentalis*

Mit der Säurefraktion (siehe IV.B.2.4) und mit der nach IV.B.2.5.3 aufgereinigten Neutralfraktion wurden Versuche zur Identifizierung der Verbindungen durchgeführt. Bei diesen Versuchen wurden Umsetzungen im Mikromaßstab angesetzt, und anschließend erfolgte eine GC-MS-Analyse der Produkte (siehe III.B.2.1 bis III.B.2.4). Als Vergleich dienten Modellsubstanzen, um zu kontrollieren, ob und wie weit die Versuchsbedingungen zu relevanten Ergebnissen führen. Sie wurden unter dem Gesichtspunkt der Strukturaufklärung der Säurefraktion ausgewählt. Die Massenspektren zu einzelnen Versuchen sind im Kapitel Massenspektroskopie IV.C.3.1.1 und IV.C.3.2.1 dargestellt.

3.1 Versuche zur Identifizierung der Verbindung der Neutralfraktion

3.1.1 Acetylierung mit Acetylchlorid

Die Neutralfraktion sowie die eingesetzten Vergleichsverbindungen (siehe III.B.2.3) werden mit Acetylchlorid zum entsprechenden Acetylderivat umgesetzt. Bei der Neutralfraktion läßt sich dies an einer Verschiebung der Retentionszeit gaschromatographisch nachweisen.

Abb.22 zeigt die Gaschromatogramme der Neutralfraktion (a) vor und (b) nach der Umsetzung mit Acetylchlorid. Die Retentionszeit der Verbindung

5 der Neutralfraktion ist um 3 min verschoben. Dies bedeutet, daß mindestens eine OH-Funktion im Molekül anwesend sein muß. Das Massenspektrum zeigt keine Unterschiede. Nach der Umsetzung sind die Intensitäten minimal niedriger.



Abb.22: Gaschromatogramm der Verbindung **5** der Neutralfraktion (a) vor und (b) nach der Umsetzung mit Acetylchlorid. Säule: Quarzkapillare SE 54 ; 20 m ; Trägergas: Helium (flowrate $2\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$) ; Temperaturprogramm: 50°C bis 250°C mit $5^\circ\text{C}/\text{min}$; Injektortemperatur: 240°C ; Injektion: Split-los auf die kalte Säule bei ca 3 bar Druck .

3.1.2 Oxidation mit Kaliumpermanganat

Bei der Umsetzung mit Kaliumpermanganat erfolgt keine Reaktion. Die Verbindung ist unter diesen Bedingungen nicht oxidierbar. Es muß sich also um eine Verbindung handeln, die nicht leicht zu oxidieren ist.

3.1.3 Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid

Die Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid erfolgt, wie bei den Vergleichsverbindungen (siehe III.B.2.3), zu einem definierten Produkt. Das Gaschromatogramm ist in Abb.23 dargestellt. Die Retentionszeit ist in diesem Fall um ca 1 min verschoben. Das Massenspektrum ergibt eine Verbindung mit einem Molekulargewicht von 240, was einer Erhöhung um 2 entspricht. Dies bedeutet, daß in dieser Verbindung eine CO-Funktion zu einer Alkohol-Gruppierung reduziert wurde. Das Massenspektrum ist unter IV.C.3.1.1 diskutiert.

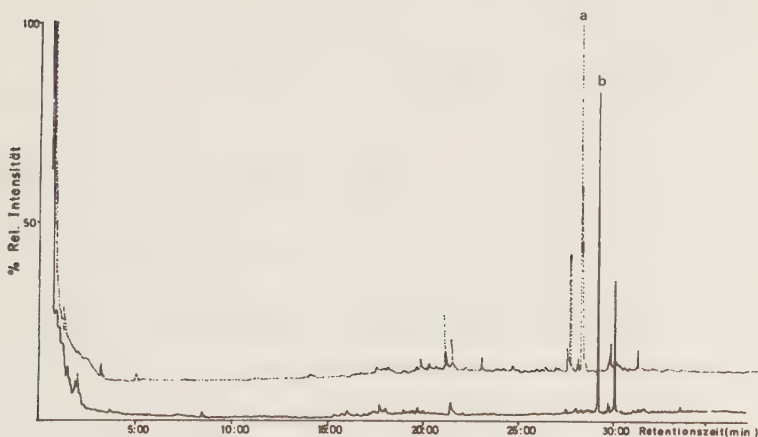


Abb.23 : Gaschromatogramm der Verbindung 5 der Neutralfraktion vor (a) und nach (b) der Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid. Säule Quarzkapillare SE 54; 20 m; alle weiteren Bedingungen siehe Abb.22

3.1.4 Derivatisierung mit BSTFA

Bei der Derivatisierung erfolgt keine Umsetzung. Dies bedeutet, daß die nach den Acetylierungsversuchen zweifellos vorhandene OH-Gruppe im Molekül sterisch gehindert vorliegen muß, sodaß mit BSTFA keine Derivatisie-

rung erfolgt.

3.2 Versuche zur Identifizierung der Säurefraktion

Die Trennung und Strukturaufklärung der isomeren Verbindungen der Säurefraktion waren ein Haupt-Ziel dieser Arbeit über die Keimungshemmstoffe in *Thuja occidentalis*. Lohaus (1985) hatte für diese Verbindungen eine monoterpenartige Struktur postuliert. Die Ringstruktur sollte ein Thujangerüst mit einer OH-Funktion und einer Carboxygruppe sein, wobei die Stellung der einzelnen Gruppe nicht abgeklärt war. Nach den einzelnen Schritten der Aufarbeitung können diese Verbindungen, wenn sie Säuren sind, nicht in der Hexan-Essigester-Fraktion isoliert werden. Man würde für eine freie Säure bei der Chromatographie an Kieselgel Si 60 eine Elution mit Methanol oder im äußersten Fall mit Aceton erwarten. Demgegenüber wurden die gesuchten Verbindungen, die durch ihre charakteristischen Massenspektren identifiziert wurden, in der hier vorliegenden Arbeit bereits in der mit Hexan-Essigester von der Kieselgelsäule eluierten Fraktion nachgewiesen. Dieser Widerspruch konnte erst geklärt werden, nachdem der Nachweis der Bildung dieser Verbindung aus einer unpolaren Vorstufe gelang (siehe IV.B.3.2.4). Die Bruchstücke der Massenspektren (siehe IV.C.3.2) zeigen im wesentlichen die Fragmente der Substanzklasse der Monoterpene, sodaß bei den Versuchen mit den Vergleichsverbindungen Monoterpene (siehe III.B.2) eingesetzt wurden. Nach Umsetzung der Verbindung mit Diazomethan konnte, mittels hochauflösender Massenspektroskopie, die molekulare Zusammensetzung mit $C_{11}H_{18}O_3$ bestimmt werden (Lohaus, 1985). Daraus ergibt sich das Molekulargewicht von 198.

3.2.1 Derivatisierung mit BSTFA

Die isolierten sauren Verbindungen (siehe IV.B.2.4) wurden ohne vorherige Diazomethanbehandlung mit BSTFA derivatisiert. An charakteristischen Bruchstücken im Massenspektrum lassen sich die Trimethylsilylether eindeutig

erkennen. Es sollte also geklärt werden, ob man durch Derivatisierung mit BSTFA möglicherweise eine bestimmte Substanzklasse der Verbindungen erkennen kann.

Abb.24 zeigt das Gaschromatogramm der GC-MS-Analyse der Säurefraktion nach Derivatisierung mit BSTFA. Die Retentionszeit der beiden Isomeren ist gegenüber der mit Diazomethan versetzten Probe (siehe Abb.16) um 2,6 min verschoben. Die Massenspektren ergeben ein Molekulargewicht der Verbindungen von 184. Nach den massenspektroskopischen Untersuchungen (siehe IV.C.3.2.1 und für die Vergleichsverbindungen III.B.2.4) ist keine Alkohol-, sondern eine Carboxy-Funktion in den Molekülen enthalten. Dies steht im Einklang mit dem Molekulargewicht für eine einbasige Carbonsäure, da sich für den Methylester ein Molekulargewicht von 198 ergibt.

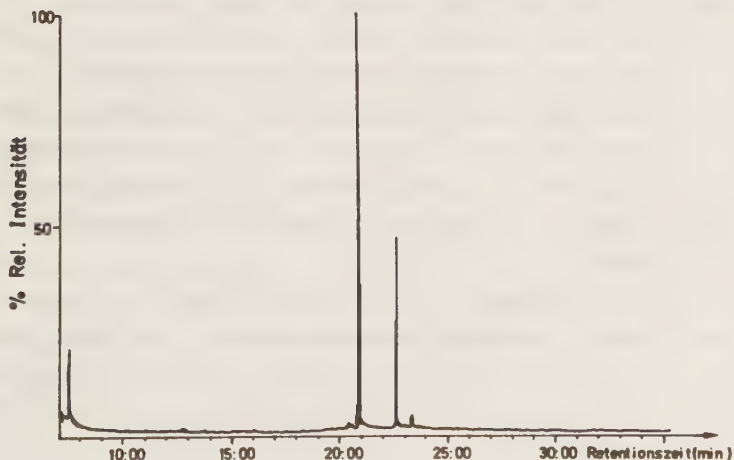


Abb.24: Gaschromatogramm der GC-MS-Analyse der Säurefraktion nach Derivatisierung mit BSTFA. Säule: Quarzkapillare SE 54; 30 m; Temperaturprogramm: 50°C bis 250°C mit 5°C/min; Injektor: 240°C; Injektion: splitlos auf die kalte Säule; Detektion: TIC

3.2.2 Acetylierung mit Acetylchlorid

Es galt abzuklären, ob eine OH-Funktion in den Molekülen vorhanden ist. Die Umsetzung mit Acetylchlorid, in der mit Diazomethan umgesetzten Säurefraktion, ergab keine Änderung der Retentionszeit bei der Gaschromatographischen Untersuchung. In den Massenspektren ließ sich keine Veränderung feststellen. Dies muß bedeuten, daß die Annahme einer OH-Funktion in den Isomeren falsch ist, da sich alle eingesetzten Monoterpenalkohole ohne Schwierigkeiten unter den gewählten Bedingungen umsetzen lassen (siehe III.B.2.1).

3.2.3 Chromatographie der Säurefraktion an Kieselgel Si 60

Ist tatsächlich eine Säure-Funktion in den Isomeren enthalten, lassen sich alle Säuren bis auf diese abtrennen (siehe dazu auch Abb.16). Die Polarität von Hexan-Essigester 50:50 bei der Chromatographie an Kieselgel ist nicht hoch genug, um freie Säuren zu isolieren. Zunächst wurde überprüft, ob sich die isomeren Verbindungen der Säurefraktion bei der Chromatographie an Kieselgel mit der Polarität Hexan-Essigester 50:50 eluieren lassen.

Das Material einer Präparation nach Chromatographie an Sephadex LH 20 wurde in unveresterter Form aufgetragen und mit der Hexan-Essigester-Polarität 50:50 eluiert (siehe III.B.2.5). Anschließend wurde die Probe mit Diazomethan verestert und im Gaschromatographen analysiert. Es ließ sich gaschromatographisch keine Substanz nachweisen. Offensichtlich wurden die Isomeren an Kieselgel adsorbiert und unter diesen Bedingungen nicht eluiert. Dies bedeutet, daß die gesuchten isomeren Verbindungen von Anfang an nicht vorhanden sein konnten, denn sie sollten bei der Chromatographie an Kieselgel adsorbiert bleiben und mit Hexan-Essigester nicht eluiert werden. Sie müssen also bei dem anschließenden Isolierungsschritt, nämlich der Chromatographie an Sephadex LH 20, entstehen. Die Verbindungen der Neutralfraktion kommen bei dem Isolierungsschritt für eine längere Zeit mit

Wasser in Berührung. In der Neutralfraktion ließen sich die Verbindungen Fenchon, α -Thujon, Campher und die nicht identifizierten Verbindungen 4 und 5 nachweisen. Es könnte also sein, daß die Isomeren aus einer der Substanzen der Neutralfraktion entstehen.

Es wurde zunächst überprüft, ob sich die gesuchten Verbindungen aus den Monoterpenen durch Umsetzung mit Wasser bei Raumtemperatur bilden.

3.2.4 Umsetzung von Thujon, Fenchon und Campher in Wasser

Der Versuch wurde durchgeführt wie unter III.B.2.6 beschrieben. Die Monoterpene Fenchon und Campher konnten unverändert zurückgewonnen werden. Es entstand keine weitere neue Verbindung. Das Thujon zeigte in der mit Ether ausgeschüttelten pH 1 Fraktion nach Veresterung mit Diazomethan die beiden gesuchten Isomeren (nicht abgebildet).

Eine direkte Reaktion zu den Säuren ist mit Wasser aufgrund der Struktur des Thujons nicht denkbar. Es muß eine Oxidation erfolgen, damit eine Säure entstehen kann. Bereits 1892 beschreibt Wallach in seinem Artikel über die Bestandteile des Thujaöls, daß das Thujon besonders leicht von allen Oxidationsmitteln angegriffen wird und dabei die sogenannte Thujaketosäure [(1-Isopropyl-2-acetyl-cyclopropan)-2-ethansäure] entsteht. Eine Oxidation durch den Sauerstoff der Luft wäre im Fall der oben beschriebenen Versuche denkbar.

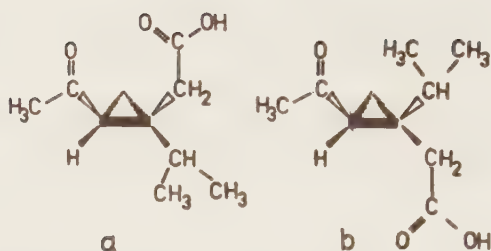


Abb.25: Struktur der (a) cis- und (b) trans-Thujaketosäure

Abb.25 zeigt die Struktur der beiden isomeren Formen der Thujaketosäure. Die Massenspektren lassen sich mit dieser Struktur in Einklang bringen. Thujaketosäure wurde daraufhin aus Thujon synthetisiert (siehe III.B.3) und die Massenspektren mit den isolierten Isomeren verglichen. Es ergaben sich die gleichen Massenspektren (siehe IV.C.3.2 und IV.C.3.2.1).

Da es sich bei diesen isomeren Verbindungen um Aufarbeitungsartefakte handelt, wurde eine quantitative Bestimmung des Gehalts an Thujaketosäure nicht durchgeführt. Es wurde jedoch die Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* bestimmt.

Tab.17: Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* : (a) Thujaketosäure und (b) Thujaketosäuremethylester.

Konzentration [Mol / l] x 10 ⁻³	% Keimungshemmung	
	a	b
1,0	100	100
0,75	77	100
0,5	45	97
0,25	9	17

Tab.17 zeigt den Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* der Thujaketosäure (a) und des Thujaketosäuremethylesters (b). Man sieht auch hier, wie im Fall der Abscisinsäure und ihres Methylesters, einen Anstieg in der Keimungshemmung. Vergleicht man die Keimungshemmung des Thujons mit der Thujaketosäure, so ergibt sich für die 50% ige Keimungshemmung eine Molarität des Thujons von $6,46 \times 10^{-4} \text{ Mol/l}$ (Gemisch aus α - und β -Thujon; Spraul, 1987) und der Thujaketosäure von $5,52 \times 10^{-4} \text{ Mol/l}$. Das entspricht einer Steigerung um das 1,2 fache der Keimungshemmung, die durch die Oxidation zur Thujaketosäure erzielt wird.

Eine derartige Oxidation von Thujon sollte in der Umgebung einer *Thuja occidentalis* Pflanze ebenfalls ablaufen. Dies könnte für die allelopathische Wirkung bedeutsam sein, da Thujaketosäure weniger flüchtig ist als Thujon und daher über einen längeren Zeitraum auf keimende Samen in der Nachbarschaft von Thuja-Pflanzen einwirken kann.

Als nächstes wurde überprüft, innerhalb welcher Zeit derartige Umsetzungen erfolgen können.

4. Untersuchungen über die Umwandlung der Monoterpene Thujon und Sabinen

Ein anderes Beispiel einer Umwandlung eines Monoterpens ist das Sabinen, welches in Wasser bei pH 4 zu Terpinen-4-ol umgewandelt wird (Spraul, 1987). In diesem Fall wird die Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* um das 4,9 fache erhöht. Für die Kinetiken wurden Warburggefäße eingesetzt, und in den Kippen wurde die dem Volumen der Gefäße entsprechende Menge in μl an Monoterpenen einpipettiert. In die Gefäße wurden zwei ml Wasser gegeben.

Bei einer derartigen Kinetik sind folgende Punkte wichtig:

1. Die Sättigung der Gasphase an Monoterpen sollte während der gesamten Versuchsdauer gleich sein, um die Grenzkonzentration der Monoterpene im Wasser zu bestimmen. Deshalb wurde der hohe Überschuß an entsprechendem Monoterpen eingesetzt.
2. Die Zeit, in der sich ein Stoff in einer Flüssigkeit löst, hängt neben der

Löslichkeit der Substanz von der Größe der Oberfläche des Lösungsmittels ab. Die Ansätze wurden während der Versuchsdauer geschüttelt, um eine große Oberfläche und damit ein schnellstmögliches Erreichen der Endkonzentration zu erzielen.

Für die Kinetik mit Sabinen bzw. Thujon im Wasser ist folgendes zu erwarten:

1. Ein Anstieg der Konzentration des Sabinens bzw. Thujons im Wasser bis zu einer Grenzkonzentration.
2. Zu einem späteren Zeitpunkt der Anstieg und Nachweis der jeweiligen Umsetzungsprodukte im Wasser und dort ebenfalls ein Anstieg bis zu einer Grenzkonzentration.

4.1 Kinetik der Umwandlung von Sabinen zu Terpinen-4-ol in Wasser ohne und mit Zusatz von Erde

Es sollte bei dieser Kinetik geprüft werden, innerhalb welcher Zeit die Bildung des Terpinen-4-ols erfolgt, und ob man durch Zusatz von Erde eine Beschleunigung der Reaktion erzielen kann. Des weiteren war die Frage, welche Grenzkonzentration an Terpinen-4-ol im Wasser erreicht wird, und inwiefern diese genügt, um eine Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* zu erzielen. Zur Durchführung des Versuches siehe III.B.4.1.1 und III.B.4.1.2.

Abb.26 zeigt die Kinetik der Umsetzung von Sabinen zu Terpinen-4-ol in Wasser (a) und in Wasser unter Zusatz von Erde (b). Die Kinetik in Wasser wurde über einen Zeitraum von neun Tagen untersucht. Für die Kinetik unter Zusatz von Erde konnten nur Werte innerhalb der ersten 30 Stunden bestimmt werden, da während dieser Zeit die Erde sehr stark aufquillt, so daß sich bei späteren Zeitwerten kein Wasser für eine Extraktion mehr gewinnen läßt.

Das Sabinen ist äußerst flüchtig, weshalb die quantitative Erfassung sehr schwierig ist. Für jeden Zeitwert wurden zwar jeweils zwei Warburgkölbchen eingesetzt, die Werte in (a) lassen sich jedoch nur als Schwankungen um die Grenzkonzentration des Sabinens im Wasser interpretieren. Es be-

deutet also, daß bereits nach 24 Stunden die maximale Konzentration im Wasser erreicht ist. Bei der Kinetik unter Zusatz von Erde (Abb 26b) erreicht das Sabinen bereits nach zwei Stunden einen Maximalwert. Danach ist eine leichte Abnahme zu erkennen. Wenn dies nicht ebenfalls eine Streuung der einzelnen Zeitwerte des Sabinens ist, besteht die Möglichkeit, daß das Sabinen an der Erde adsorbiert wird.

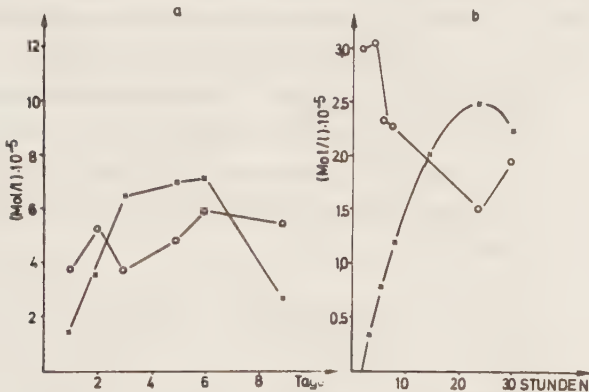


Abb.26: Konzentration des Sabinens (o—o) in Wasser und Bildung des Terpinen-4-ols (x—x). (a) Kinetik mit Wasser; (b) Kinetik mit Wasser unter Zusatz von Erde.

Für das Terpinen-4-ol läßt sich folgendes feststellen:

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Bildung des Terpinen-4-ols in Wasser und unter Zusatz von Erde läßt sich aus der Steigung der Geraden berechnen.

Für die Bildung von Terpinen-4-ol in Wasser ergibt sich

$$\frac{\delta x}{\delta t} = 1,01 \times 10^{-6} \text{ [Mol x l}^{-1} \text{ x h}^{-1} \text{]}$$

Im Vergleich dazu die Bildung von Terpinen-4-ol in Wasser unter Zusatz von Erde

$$\frac{\delta x}{\delta t} = 1,74 \times 10^{-6} \text{ [Mol x l}^{-1} \text{ x h}^{-1} \text{]}$$

Unter Zusatz von Erde wird die Reaktion um ungefähr das 1,7 fache be-

schleunigt.

In Wasser wird nach 5 Tagen eine Grenzkonzentration von $7,2 \times 10^{-5}$ Mol/l erreicht. Unter Zusatz von Erde läßt sich als maximale Konzentration $2,5 \times 10^{-5}$ Mol/l nachweisen. Für eine 50% ige Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* wird eine Konzentration von 3×10^{-4} Mol/l benötigt. In beiden Fällen werden die für eine Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* benötigten Konzentrationen nicht erreicht. Die Konzentrationen an Terpinen-4-ol nehmen in (a) nach sechs Tagen und in (b) nach 24 Stunden wieder ab. Es lassen sich keine neuen Verbindungen durch Ausschütteln bei pH 1 mit Ether und anschließender Veresterung mit Diazomethan nachweisen. Ob die Abnahme der Konzentration an Terpinen-4-ol mit den gewählten Versuchsbedingungen im Zusammenhang steht, bedarf weiterer Untersuchungen.

4.2 Kinetik der Oxidation von Thujon zu Thujaketosäure

Mit diesem Versuch sollte untersucht werden, in welchem Zeitraum wieviel Thujaketosäure aus Thujon durch Oxidation mit dem Luftsauerstoff gebildet wird und im Wasser nachgewiesen werden kann. Daneben sollte untersucht werden, ob das Thujon im Wasser Konzentrationen erreicht, die Keimungshemmung bewirken. Auf eine Kinetik unter Zusatz von Erde wurde verzichtet, da bei den Versuchen mit Terpinen-4-ol keine wesentliche Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit erzielt werden konnte (siehe III.B.4.2).

Abb.27 zeigt die Konzentration des Thujons in Wasser in Abhängigkeit von der Zeit (a) nach Übertragung durch die Gasphase. Nach 18 Tagen wird eine Grenzkonzentration erreicht. Die Grenzkonzentration entspricht $1,48 \times 10^{-4}$ Mol/l. Für eine 50 % ige Keimungshemmung des Thujons wird z.B. an *Amaranthus caudatus* eine Konzentration von $6,46 \times 10^{-4}$ Mol/l (Gemisch aus α - und β -Thujon) benötigt (Spraul, 1987).

In Abb.27b ist die Bildung der Thujaketosäure in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Sie erreicht einen Maximalwert nach 12 Tagen mit $1,12 \times 10^{-6}$ Mol/l und wird mit einer Reaktionsgeschwindigkeit von

$4,58 \times 10^{-9} \text{ [Mol l}^{-1} \times \text{h}^{-1}]$ gebildet. Der Gehalt an Thujaketosäure nimmt nach 18 Tagen etwas ab. Dies kann an der Schwankung der einzelnen Meßwerte liegen. Für jeden Zeitwert wurden zwei Warburgkölbchen eingesetzt und die Werte dann gemittelt. Jeder Wert ist mit einem Fehler von durchschnittlich $\pm 5\%$ behaftet.

Von den erreichten Grenzkonzentrationen an Thujon bzw. Thujaketosäure genügt keine allein, um eine Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* zu bewirken.

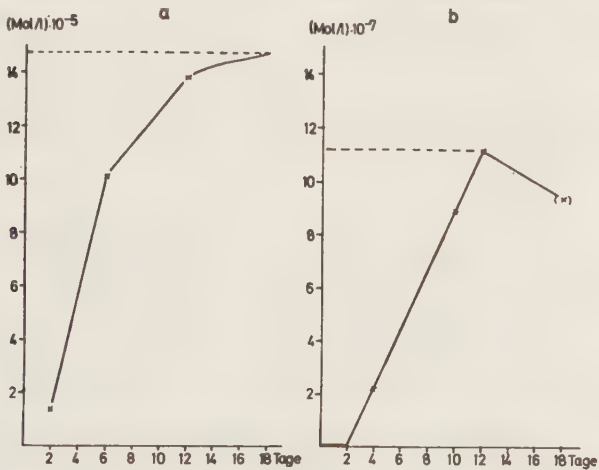


Abb. 27: Kinetik der Konzentration des α -Thujons in Wasser (a) und der Bildung der Thujaketosäure (b) in Abhängigkeit der Zeit.

Im Vergleich der Kinetiken läßt sich feststellen, daß die Reaktion zum Terpinen-4-ol schneller abläuft, als sich das Thujon in Wasser anreichert.

Aus diesen Ergebnissen folgt aber auch, daß die Monoterpene durch Anreicherung im Wasser keine Keimungshemmung bewirken können. In allen Fällen ist die unter den gewählten Bedingungen, die extrem sind, die maximale Grenzkonzentration an Monoterpenen niedriger, als die für eine Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* benötigte Menge.

Spraul (1987) hatte jedoch eine Keimungshemmung an *Lepidium sativum*

durch verdampfbare Substanzen aus *Thuja occidentalis* erzielen können. Er legte die Samen von *Lepidium sativum* in eine große Biotestschale und unterschiedliche Mengen an Thujablättern auf den Boden einer kleinen Petrischale, die in die große Biotestschale gestellt wurde. Mit diesem Versuchsansatz konnte er eine Abhängigkeit der Keimungshemmung von der eingewogenen Menge an Thujablättern nachweisen. Er ging davon aus, daß die Monoterpene über die Gasphase in das Wasser übertragen werden und von dort in den Samen gelangen. Diese Annahme nun muß aufgrund der erzielten Grenzkonzentrationen an Terpinen-4-ol und Thujon ausgeschlossen werden.

Die Übertragung der Monoterpene auf die Samen kann also nur direkt über die Gasphase erfolgen. Um dies zu überprüfen wurden folgende Versuche durchgeführt.

5. Untersuchungen über die keimungshemmende Wirkung von Thujon

Für diese Untersuchungen wurde Thujon ausgewählt, da es das Monoterpen ist, das mit der höchsten Konzentration in *Thuja occidentalis* vorliegt (siehe III.B.5).

Es wurden Keimungshemmtests in gleichen Konzentrationen an Thujon im Vergleich angesetzt. Einmal wurden die entsprechenden Konzentrationen direkt dem Wasser zugesetzt. Im anderen Fall wurden die Mengen an Thujon in kleine Gefäße in den Biotestschalen gegeben, sodaß die Wirkung über die Gasphase erfolgen muß. Als Samenmaterial wurde *Amaranthus caudatus* verwendet.

Tab.18 zeigt den Vergleich der Keimungshemmung des Thujons an *Amaranthus caudatus* durch direkte Gabe im Wasser (a) und durch Übertragung in der Gasphase (b). Es werden in beiden Fällen für die gleichen Konzentrationen dieselbe Keimungshemmung erzielt. Dies bedeutet aber auch, daß die Samen bei beiden Biotestansätzen für die gleiche Hemmung entsprechende Mengen an Thujon aufnehmen sollten. Nach den Ergebnissen der Kinetik, die unter extremen Bedingungen abläuft, werden im Wasser erst nach

sechs Tagen nennenswerte Mengen (1×10^{-4} Mol/l) an Thujon nachgewiesen, die aber, wie in Tab.18 zu ersehen ist, für eine Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* nicht ausreichen.

Tab.18: Vergleich der Keimungshemmung von Thujon an *Amaranthus caudatus* nach direkter Einwirkung auf die Samen (a) und nach Übertragung durch die Gasphase (b).

Konzentration an Thujon [Mol/l] $\times 10^{-3}$	% Keimungshemmung	
	a	b
2,50	100	100
1,00	57	63
0,75	49	38
0,50	35	37
0,25	26	11

Um zu überprüfen, ob und wieviel Thujon von den *Amaranthus caudatus* Samen aufgenommen wird, wurden die Ansätze mit der Konzentration von $2,5 \times 10^{-3}$ Mol/l wiederholt. Bei der ersten Versuchsserie wurden keine Samen in die Biotestschalen gegeben, um zu bestimmen, ob in beiden Fällen nach zwei Tagen dieselbe Menge an Thujon im Wasser nachzuweisen ist. Die Bestimmung wurde für diesen Versuchsansatz in drei Parallelproben angesetzt, um eine Quantifizierung durchführen zu können. Es ließ sich jedoch in keiner Probe Thujon gaschromatographisch nachweisen. Die Grenzkonzentration für den Nachweis einer Thujon-Lösung im Gaschromatographen beträgt ungefähr 1×10^{-4} Mol/l. Dies bedeutet für die direkte Zugabe von Thujon ins Wasser, daß das Thujon in die darüber befindliche Gasphase, die nicht mit Thujon gesättigt ist, entweicht. Im Fall der Übertragung durch die Gasphase läßt sich feststellen, daß auch bei diesem Ansatz das Thujon nicht in ausreichender Menge ins Wasser gelangt, um von dort Keimungshemmung

zu bewirken .

Bei der zweiten Versuchsserie wurden zu jedem Ansatz jeweils 25 *Amaranthus caudatus* Samen gegeben . Es wurden jeweils drei Parallelproben angesetzt , um eine anschließende Quantifizierung des Thujons in den Samen vornehmen zu können . Alle Proben wurden getrennt aufgearbeitet wie unter III.B.5 beschrieben . In Tab.19 ist das Ergebnis dargestellt .

Tab.19 : Vergleich der aufgenommenen Menge an Thujon in Mol / Samen für die drei Parallelproben . (a) Direkte Zugabe von Thujon ins Wasser ; (b) Aufnahme des Thujons über die Gasphase .

Bestimmung	Konzentration an Thujon in [Mol / Samen] $\times 10^{-10}$	
	a	b
1	3,73	3,38
2	3,20	3,29
3	3,00	3,34

Daraus ergeben sich die gemittelten Werte für die Aufnahme bei der direkten Zugabe von Thujon ins Wasser von $3,31 \times 10^{-10}$ Mol / Samen . Bei der Aufnahme über die Gasphase ergibt sich ein Wert von $3,34 \times 10^{-10}$ Mol / Samen . In beiden Fällen wird also dieselbe Menge an Thujon im Samen aufgenommen . Da im Wasser ohne Samen nach zwei Tagen kein Thujon nachgewiesen werden kann , müssen die Samen bevorzugt das Thujon aufnehmen können . Da das Volumen des gequollenen Samens von *Amaranthus caudatus* $1,5 \mu\text{l}$ beträgt , ergibt sich eine Konzentration von $2,2 \times 10^{-4}$ Mol / l Samen . Ursprünglich liegt Thujon in einer Konzentration von $2,5 \times 10^{-3}$ Mol / l vor . Die Konzentration in den Samen entspricht also ungefähr einem Zehntel der Ausgangskonzentration .

Es bedeutet aber auch , daß das Thujon nicht vorher im Wasser gelöst sein kann , sondern daß eine Wirkung direkt über die Gasphase erfolgen muß .

6. Diskussion der Ergebnisse

6.1 Isolierung von Keimungshemmstoffen aus Thuja occidentalis

Für *Thuja occidentalis* wurde eine neue Isolierungsmethode ausgearbeitet, bei der die Raumtemperatur nicht überschritten wird. Im Gegensatz zur von Lohaus (1985) angewendeten Heißextraktion konnte bei dieser Methode keine Abscisinsäure nachgewiesen werden. Lohaus (1985) hatte den Gehalt an Abscisinsäure mit 3 - 4 µg/g Frischgewicht bestimmt.

Wenn ABA vorhanden ist, sollte man erwarten, daß man im Vergleich der Keimungshemmtests an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* diejenige Fraktion erkennen kann, die die Abscisinsäure enthält (siehe IV.B.2.1.3 und IV.B.2.3.1.3). Es ergeben sich zu keinem Zeitpunkt der Isolierung drastische Unterschiede in der Keimungshemmung der angewandten Samenmaterialien, wie das bei *Sorbus aucuparia* nach der Chromatographie an Sephadex LH 20 der Fall ist (siehe IV.B.2.3.2). Es wurden alle anderen Fraktionen, die Keimungshemmung zeigten, auf die Anwesenheit von Abscisinsäure untersucht. Sie konnte im Gegensatz zur Heißextraktion (siehe IV.B.2.7) nicht nachgewiesen werden.

Die Abscisinsäure könnte in glykosidisch gebundener Form vorliegen. Bisher identifizierte Glykoside der Abscisinsäure liegen als O-Glykoside vor (Loveys und Milborrow, 1981), die entweder in Stellung 1 am Ring oder an der Säurefunktion glykosiliert sind. Diese Glykoside lassen sich im Alkalischen bei Raumtemperatur spalten, sodaß freie Abscisinsäure entsteht. Der Pflanzenextrakt aus *Thuja occidentalis* hat einen pH von 2 bis 3. Da Ether- und Esterspaltung auch im sauren Medium ablaufen können, ist es möglich, daß eine Spaltung eines möglichen Glykosids durch Kochen mit Wasser erfolgt. Im Vergleich von Heißextraktion und Kaltextraktion sollte die Bildung der freien Abscisinsäure bei der Heißextraktion begünstigt sein, da im allgemeinen eine Aktivierung eines Reaktionsablaufes durch Energiezufuhr gefördert wird. Es muß also davon ausgegangen werden, daß die Glykosidspaltung bei Raumtemperatur nicht erfolgt.

In glykosidischer Form ist die Abscisinsäure mit der angewandeten Methode aus dem Methanolextrakt nicht extrahierbar und auch nicht über den Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* zu erkennen. Es bedeutet aber auch, daß sie gegenüber den anderen extrahierten Keimungshemmstoffen für eine mögliche Wirkung auf die Samen anderer Pflanzen unwichtig ist.

Es ist an dieser Stelle die Frage zu stellen, wie umfassend man mit Hilfe einer Isolierungsmethode alle vorhandenen Keimungshemmstoffe nachweisen kann. Nicht jede Isolierungsmethode eignet sich zur Aufreinigung aller Substanzklassen. Die angewandte Kaltextraktion eignet sich nicht zur Bestimmung der Monoterpene in *Thuja occidentalis*, während die von Spraul (1987) angewandte Isolierungsmethode der Monoterpene (Extraktion mit Lösungsmitteln niedriger bis mittler Polarität) sich nicht zur Extraktion von polareren Verbindungen eignet. Man muß also für einzelnen Substanzklassen spezifische Präparationsmethoden ausarbeiten und damit die Pflanzenmaterialien aufarbeiten.

6.2 Isolierte Keimungshemmstoffe aus *Thuja occidentalis*

6.2.1 Isolierte Verbindung 5 der Neutralfraktion

Der augenblickliche Kenntnisstand besagt, daß die Verbindung sehr aktiv ist. Sie zeigt eine Keimungshemmung von 50% bei ca $7,4 \times 10^{-5}$ Mol/l (siehe IV.B.2.5.3). Vergleicht man diesen Wert mit der Hemmwirkung der aus *Sorbus aucuparia* (ABA ausgenommen) und *Thuja occidentalis* isolierten Keimungshemmstoffen, so ergibt sich, daß diese Verbindung um ca. eine Zehnerpotenz aktiver ist. Da diese Verbindung nicht besonders flüchtig ist, kann eine Wirkung entweder durch Auswaschen der Blätter (*Thuja* zeigt kaum Blattfall) oder über die Wurzel erfolgen.

6.2.2 Thujaketosäure

Thujaketosäure entsteht durch Oxidation aus Thujon. Über die Oxidation von Thujon zu Thujaketosäure schreibt Wallach (1892), daß sie sehr leicht abläuft. Möglicherweise läuft die Oxidation unter genügend Sauerstoffzufuhr noch weiter ab, da Thujon zur (1-Isopropyl-2-carboxy-cyclopropan)-2-ethansäure oxidierbar ist (Whittaker und Banthorpe, 1972). In der Natur wäre auch eine photolytische Reaktion denkbar. Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Photolyse zeigen, daß im ersten Schritt der Reaktion ein Diradikal gebildet wird (Cooke und Lyon, 1971; Eastman et al, 1963). Auf jeden Fall läßt sich sagen, daß das Thujon sicherlich zu einem Teil in Thujaketosäure überführt wird. Durch die Oxidation erhöht sich die Keimungshemmung nur unwesentlich, nämlich um den Faktor 1,2 (siehe IV.B.3.3.6).

6.2.3 Monoterpene

Die Monoterpene gehören zu den sekundären Stoffwechselprodukten der Pflanzen. Sie werden in der Literatur als allelopathisch wirkende Substanzen beschrieben, die die Keimung und das Wachstum von anderen Pflanzen in der Nachbarschaft beeinflussen können (Rice 1987).

Campher und 1,8-Cineol konnten in verschiedenen Pflanzenmaterialien nachgewiesen und ihre keimungshemmende Wirkung auf Samen anderer Pflanzen untersucht werden (Charlwood und Banthorpe, 1978; Friedman, 1987).

In Kiefernterpentinöl und Tannenzapfenöl wurden α -, β -Pinen, Car-3-en, Dipenten, Limonen, Bornylacetat und Borneol identifiziert. Mit Ausnahme des Camphens erwiesen sie sich als gute Keimungshemmstoffe auf Fichten- und Kiefernnsamen (Dässler, 1959a und Dässler, 1959b).

Untersuchungen über die Wirkung der Monoterpene Campher, Pulegon, Borneol, 1,8-Cineol, Limonen, α -Phellandren, p-Cymen, α -Pinen und β -Pinen im Vergleich zur Blausäure wurden von Asplund (1968) an *Raphanus sativus* durchgeführt. Dabei zeigten sich Campher und Pulegon als Keimungshemm-

stoffe mit größerer Wirkung als Blausäure.

Rizvi, S. und Rizvi, V. (1987) testeten Geraniol auf Keimungshemmung an *Amaranthus spinosus*. Geraniol hemmt die Keimung zu 90% bei einer Konzentration von 2 mM.

Von allen isolierten Keimungshemmstoffen aus *Thuja occidentalis* sind die Monoterpene sicherlich die wichtigsten Verbindungen. Da *Thuja occidentalis* als immergrüne Pflanze keinen massiven Blattfall zeigt, kann die keimungshemmende Wirkung nur über die Gasphase oder die Wurzel erfolgen.

Die in *Thuja occidentalis* nachgewiesenen Monoterpene (Spraul, 1987) wurden auf fünf unterschiedliche Arten mit organischen Lösungsmittel ähnlicher Polarität extrahiert. Die durchschnittliche prozentuale Verteilung der Monoterpene sowie ihre keimungshemmende Wirkung an *Amaranthus caudatus* ist in Tab.20 dargestellt.

Tab.20: Monoterpene aus *Thuja occidentalis*. (a) Prozentuale Verteilung der Monoterpene; (b) 50% Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* in $[\text{Mol/l}] \times 10^{-3}$

Monoterpen	a	b
α -Thujon	63,0	0,54
Fenchon	11,9	1,05
β -Thujon	7,7	1,09
Sabinen	6,8	1,37
Bornylacetat	3,9	0,99
α -Pinen	1,8	2,76
Campher	1,6	0,92
Camphen	1,5	1,45
Myrcen	1,3	1,57
Limonen	1,2	1,43
Terpinylacetat	1,0	3,66

Weitere Spurenkomponenten , die nicht quantifiziert werden konnten sind:

α -Thujen , p-Cymen , Thymol , Fenchylacetat , Borneol , Terpinen - 4 - ol und α -Terpineol .

α -Thujon ist die Hauptkomponente in *Thuja occidentalis* . Ihr durchschnittlicher Gehalt wurde mit 2,73 mg/g Frischgewicht bestimmt . Des weiteren sind Fenchon , β -Thujon und Sabinen in größeren Mengen enthalten .

Bei der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* zeigen alle Monoterpene , die eine Sauerstoffgruppe tragen (Terpinylacetat ausgenommen) , eine höhere Aktivität als die Monoterpenkohlenwasserstoffe . Von den Monoterpenketonen zeigt α -Thujon die größte keimungshemmende Wirkung .

Es läßt sich also sagen , daß von allen in *Thuja occidentalis* nachgewiesenen Monoterpenen α -Thujon die wichtigste Verbindung ist . Es zeigt die höchste Konzentration und auch die höchste Keimungshemmung aller in *Thuja occidentalis* nachgewiesenen Monoterpene .

6.3 Keimungshemmende Wirkung der Thuja occidentalis Pflanze auf die Umgebung

Für allelopathische Pflanzen werden drei Wirkmechanismen diskutiert .

Die Abgabe der Substanzen kann über die Blätter (Bode, 1940), die Wurzel (Rice, 1984) oder über die Gasphase (Friedman, 1987) erfolgen .

Für Thuja occidentalis läßt sich feststellen :

1. Die bei der Kaltextraktion isolierte, weniger flüchtige Verbindung 5 könnte eine mögliche Bioaktivität über die Wurzel oder durch Auswaschen der Blätter bei Regen zeigen . Wie wichtig diese Substanz für die allelopathischen Wirkungen von Thuja occidentalis ist, läßt sich erst nach der Strukturaufklärung und Synthese untersuchen .
2. Es werden Monoterpene an die Umgebung abgegeben, die durch Oxidation oder durch Umlagerung im Wasser eventuell in aktivere Verbindungen überführt werden . Im Fall des Thujons wird durch Oxidation Thujaketsäure gebildet, wobei die Aktivität nur um das 1,2 fache gesteigert wird . Thujaketsäure ist eine nicht flüchtige Verbindung, die im Boden angereichert werden kann . Bei den Untersuchungen über die Oxidation von Thujon zu Thujaketsäure (siehe IV.B.4.2) konnte im Wasser die für eine Keimungshemmung notwendige Konzentration nicht erreicht werden . Inwiefern dies an den gewählten Versuchsbedingungen liegen kann, läßt sich augenblicklich nicht entscheiden . Hierzu müßten Erdproben aus der Umgebung einer Thuja occidentalis Pflanze untersucht werden . Über einen längeren Zeitraum sollte sich auf jeden Fall ein Gleichgewicht einstellen . Am gesamten Gehalt der Monoterpene ist Sabinen zu 6,8% beteiligt . Es wird mit Wasser zu Terpinen-4-ol umgewandelt, wobei die Keimungshemmung um das 4,9 fache gesteigert wird (siehe IV.B.3.3.6) . Die kinetischen Versuche ergaben eine Grenzkonzentration im Wasser von $7,2 \times 10^{-5}$ Mol/l (siehe IV.B.4.1) . Terpinen-4-ol ist ebenfalls ein Monoterpene und ebenfalls flüchtig . Es ist ungefähr doppelt so aktiv wie Thujon .
3. Thujon wurde als ein Beispiel für die mögliche Wirkungsweise der Monoterpene ausgewählt, da es in Thuja occidentalis in der größten Menge im Vergleich zu den anderen Monoterpenen vorliegt . Die Anreicherung im

Wasser erfolgt bis zu einer Grenzkonzentration von $1,48 \times 10^{-4}$ Mol/l (siehe IV.B.4.2). Die Untersuchungen über die keimungshemmende Wirkung von Thujon (siehe IV.B.5) zeigen jedoch, daß die Grenzkonzentration im Wasser für die Keimungshemmung nicht ausreicht. Die Konzentration in der Gasphase allein ist für die Keimungshemmung wichtig.

Ein entsprechendes Verhalten ist für die anderen Monoterpene ebenfalls anzunehmen. Über einen längeren Zeitraum sollte sich am Boden ein Gleichgewicht aller Monoterpene (auch des Terpinen-4-ols) einstellen, die direkt über die Gasphase in die keimenden Samen gelangen und dort wirksam werden können.

C. Massenspektroskopie

1. Einleitung

Die Massenspektroskopie ist eine Analysenmethode, die zur Strukturaufklärung von Verbindungen angewandt wird. In Verbindung mit einem Gaschromatographen lassen sich Substanzgemische untersuchen. Bei der Gaschromatographie-Massenspektroskopie (GC-MS) werden die Substanzgemische zunächst im Gaschromatographen getrennt und anschließend im Massenspektrometer untersucht. Diese Methode hat den Vorteil, daß man nur sehr geringe Mengen (ungefähr 10^{-11} g / Substanz) an Substanzgemischen benötigt, um einen ersten Anhaltspunkt auf eine mögliche Struktur zu bekommen. Wichtig bei der GC-MS-Methode ist, daß die Substanzen ohne Zersetzung verdampfbar sein müssen (dies ist eine Bedingung, die bei jeder Anwendung der Gaschromatographie notwendig ist).

Das Massenspektrometer besteht im wesentlichen aus zwei Bereichen, die im Hochvakuum bei 10^{-6} bis 10^{-7} Torr arbeiten. Der erste Bereich ist die Ionisierungskammer, in welcher die zu untersuchenden Moleküle ionisiert werden. Die Ionen können auf unterschiedlichste Art (Elektronen, starke elektrische Felder, elektrische Entladung, Hitze und Wechselwirkungen mit Ionen) erzeugt werden. Bei dem angewandten Massenspektrometer werden die Substanzen aus dem Gaschromatographen direkt in die Ionisierungskammer geleitet. Dort treffen sie mit Elektronen, die auf 70 eV beschleunigt sind, zusammen. Bei diesem Vorgang werden die Substanzen ionisiert, da die Bindungsenergien einer chemischen Bindung wesentlich niedriger als 70 eV sind. Eine weitere Methode zum Ionisieren von Molekülen kann chemisch erfolgen. Dabei werden Gase wie z.B. Methan in die Ionenkammer geleitet und durch Elektronen auf folgende Weise ionisiert:



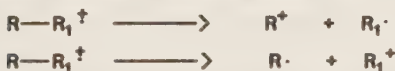
Die ionisierten Bruchstücke der Moleküle werden nun in den zweiten Bereich

gelenkt, und dort werden sie nach Größe und Ladung der Masse getrennt. Dies kann mit unterschiedlichen apparativen Anordnungen geschehen. Die häufigste Anwendung finden hierbei entweder ein magnetisches Sektorfeld oder, wie bei dem angewandten Massenspektrometer, ein Quadrupol-Massenfilter (Kienitz, 1968).

Zur Interpretation der Massenspektren muß man zunächst das Molekulargewicht bestimmen. Ist kein Stickstoff im Molekül enthalten, so ist das Molekulargewicht geradzahlig. Im allgemeinen entspricht das Molekulargewicht dem Ion mit der höchsten Masse. Es muß jedoch zusätzlich die Bedingung erfüllt sein, daß von diesem Bruchstück aus alle kleineren Massen durch chemisch sinnvolle Massendifferenzen zu erklären sind.

Für die Verteilung der Ladung und Massen bei den Fragmentierungsreaktionen gelten folgende Regeln:

- a. Durch Zusammenstoß eines Elektrons mit einem Substanzmolekül wird ein Elektron aus dem Molekül entfernt. Es entsteht ein Molekülradikalion ($M^{\cdot+}$).
- b. Ist $M^{\cdot+}$ geradzahlig und offenkettig (kein Stickstoff enthalten), werden zunächst folgende Fragmente gebildet:



Vom Detektor des Massenspektrometers werden die positiv geladenen Ionen erkannt. $R^{\cdot+}$ und $R_1^{\cdot+}$ sind ungeradzahlig und können weitere Sekundärreaktionen eingehen. Werden kleine, neutrale Moleküle (z.B. CO, CO₂, HCN, C₂H₄ und C₂H₂) eliminiert, entstehen ungeradzahlige Fragmente.



Eine weitere Reaktionsmöglichkeit besteht darin, Radikale abzuspalten. Dabei entstehen geradzahlige Radikationen und Radikale.



Die zweite Reaktion ist energetisch ungünstiger, da eine Radikalbildung erfolgt. Für offenkettige Moleküle, die keinen Stickstoff enthalten, gilt also, daß die Massenspektren im wesentlichen ungeradzahlige Fragmentationen enthalten. Für cyclische $M^{\cdot+}$ -Ionen ohne Seitenkette gilt folgendes: Zunächst wird die

Einfachbindung des Ringsystems gespalten, wobei das geradzahlige Fragment erhalten bleibt. Werden anschließend geradzahlige Neutralteilchen abgespalten, entstehen geradzahlige Radikationen. Cyclische Verbindungen erkennt man an häufiger auftretenden geradzahligen Fragmenten.

Die Fragmentierung erfolgt nach ganz bestimmten Regeln. Für einfache Kohlenwasserstoffsysteme gilt:

1. C—C-Bindungen an Verzweigungsstellen werden bevorzugt gespalten.
2. Doppelbindungen oder Doppelbindungssysteme fördern die Spaltung der allylischen oder benzyllischen Bindung (Allyl- und Benzylspaltung)

Für Verbindungen mit Heteroatomen gelten folgende Regeln:

3. Heteroatome fördern als Elektronendonatoren die Fragmentierung der Bindung an dem das Heteroatom tragenden C-Atom (α -Spaltung).
4. Doppelbindungen und Heteroatome fördern als Wasserstoffakzeptoren die Umlagerung eines Wasserstoffes in einem sechsgliedrigen (weniger oft vier oder x-gliedrigen) cyclischen Übergangszustand (McLafferty-Umlagerung).

Die Literatur zur allgemeinen Interpretation der Massenspektren ist umfangreich (Budzikiewicz, 1980; Hesse et al., 1979; Williams und Fleming, 1979; Seibl, 1974; Benz, 1969 und Kienitz, 1968).

2. Massenspektren der isolierten Keimungshemmstoffe aus *Sorbus aucuparia*

2.1 Massenspektrum der Parasorbinsäure

Abb. 28 zeigt die Massenspektren der aus *Sorbus aucuparia* isolierten (a) und der synthetischen (b) Parasorbinsäure. Die Massenspektren sind bis auf minimale Intensitätsunterschiede der Bruchstücke 39 und 41 identisch. Das Massenspektrum zeigt sehr wenige Bruchstücke, was auf eine cyclische Verbindung schließen läßt. Zusätzlich ist der Basepeak (m/z 68) geradzahlig, welches ebenfalls ein Hinweis auf eine cyclische Verbindung sein kann. Das größte Fragment mit m/z 112 sollte dem Molekulargewicht der Verbindung entsprechen, da die Bruchstücke 97 und 68 mit Δ -Werten von 15

und 44 chemisch sinnvolle Differenzen (15= Abspaltung von CH_3 -Radikal und 44= Eliminierung von CO_2) ergeben.

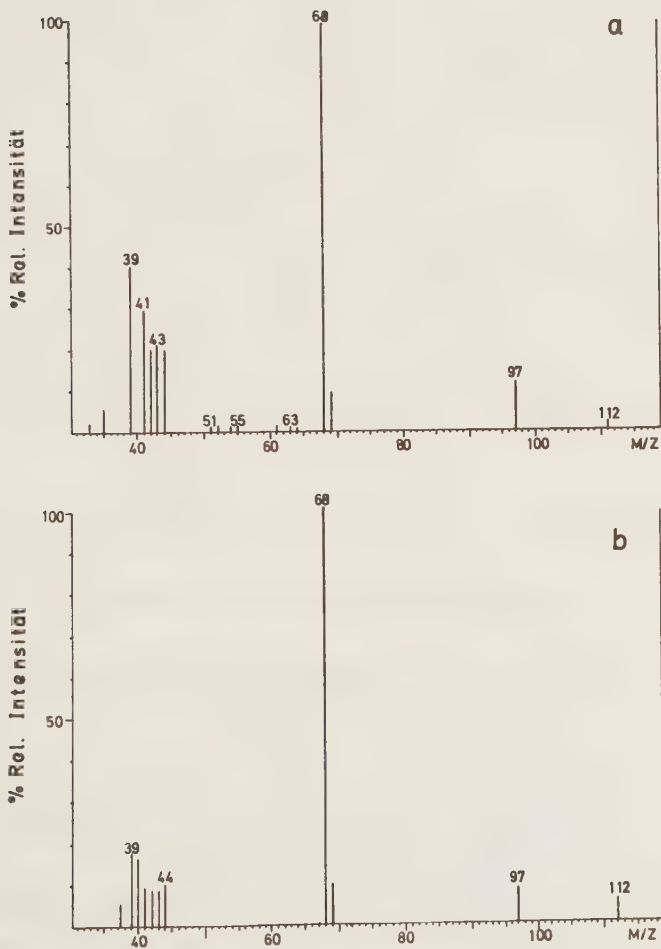


Abb.28 : Massenspektren der aus *Sorbus aucuparia* (a) isolierten und synthetischen (b) Parasorbinsäure

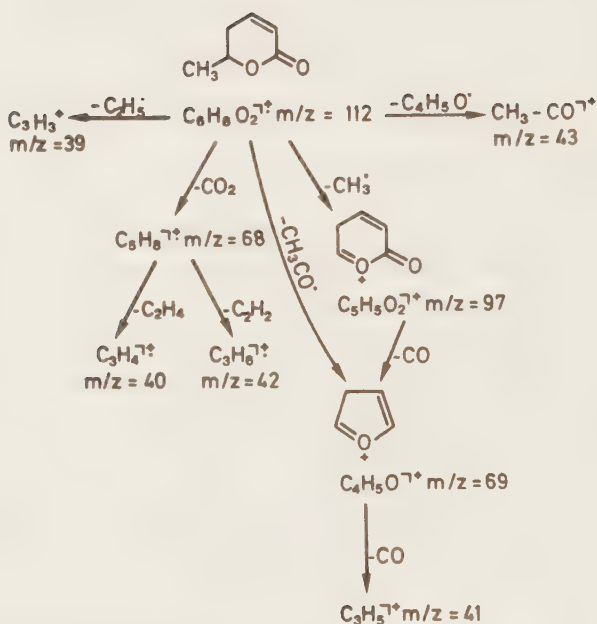


Abb.29: Fragmentierungsschema der Parasorbinsäure

Abb.29 zeigt das Fragmentierungsschema der Parasorbinsäure. Die Fragmentierung erfolgt über 3 Zerfallswege.

1. Durch Eliminierung von CO_2 wird das Bruchstück 68 gebildet. Dieses kann unter Eliminierung von Ethen zu m/z 40 oder Ethin zu m/z 42 weiter zerfallen. Hinzu kommt die Möglichkeit, ein Ethyl-Radikal abzuspalten und ein Cyclopropylion mit m/z 39 zu bilden.
2. Beim zweiten Zerfallsweg wird zunächst ein Methyl-Radikal abgespalten und m/z 97 gebildet. Dieses Fragment kann zweimal CO eliminieren und die Bruchstücke m/z 69 und m/z 41 bilden.
3. Der Ring wird geöffnet, und unter Protonenumlagerung (Radikalwanderung)

kann ein CH_3CO^+ -Ion gebildet werden.

2.2 Massenspektren des Isopropyläpfelsäuredimethylesters

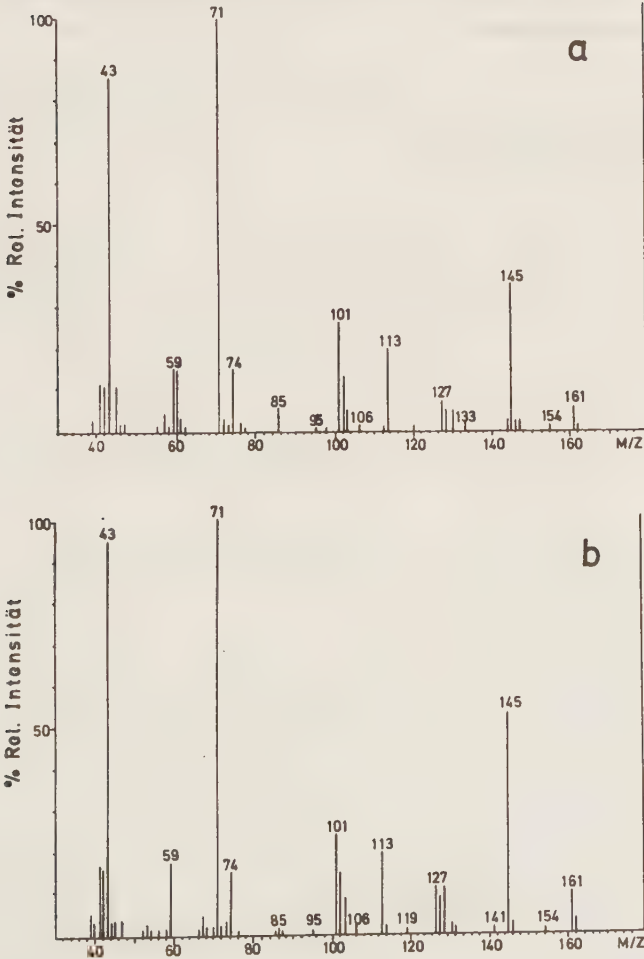


Abb.30: Massenspektren des aus *Sorbus aucuparia* isolierten (a) und synthetischen (b) Isopropyläpfelsäuredimethylesters.

Abb.30 zeigt die Massenspektren des aus *Sorbus aucuparia* isolierten (a) und des synthetischen (b) Isopropyläpfelsäuredimethylesters. Die Massenspektren stimmen bis auf minimale Intensitätsunterschiede der Fragmente m/z 145 und m/z 43 überein. Die Fragmentierung der Verbindung wurde von M. Spiteller und G. Spiteller (1979) beschrieben.

3. Massenspektroskopische Untersuchungen der isolierten Keimungshemmstoffe aus *Thuja occidentalis*

Die massenspektroskopische Untersuchung der Neutralfraktion beschränkt sich auf die Verbindung 5 der Gesamtfraction, da beim augenblicklichen Kenntnisstand diese Verbindung aller Wahrscheinlichkeit nach die Keimungshemmung bewirkt. Dem Gaschromatogramm kann man entnehmen, daß sie die Hauptkomponente der Fraktion ist (siehe IV.B.2.5.1).

3.1 Massenspektrum der isolierten Verbindung 5 der Neutralfraktion

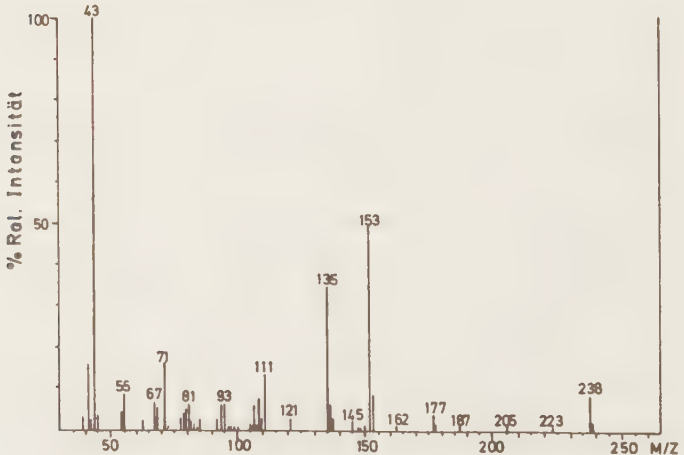


Abb.31: Massenspektrum der Verbindung 5 der aus *Thuja occidentalis* isolierten Neutralfraktion.

Abb.31 zeigt das Massenspektrum der Verbindung 5 der isolierten Neutralfraktion. Das Fragment mit der höchsten Masse (m/z 238) entspricht dem Molekulargewicht (siehe dazu auch Abb.32). Es sind relativ wenige Bruchstücke im Massenspektrum enthalten, was auf eine cyclische Struktur schließen läßt. Bei heterocyclischen Strukturen mit einer Seitenkette, die ein Sauerstoffatom enthalten, beobachtet man oft, daß zunächst die Seitenkette abgespalten wird. Dies würde für diese Verbindung bedeuten, daß wahrscheinlich eine Seitenkette mit m/z 85 vorhanden ist. Unter dieser Annahme kommen für die Seitenkette die molekularen Zusammensetzungen C_6H_{13} und C_5H_9O in Frage.

Vom Bruchstück m/z 153, welches vermutlich die Masse für die cyclische Struktur darstellt, können zwei verschiedene Spaltungen erfolgen. Einmal wird Wasser abgespalten und es entsteht das Fragment m/z 135. Eine Wasserabspaltung erfolgt bei allen Strukturen, die eine Alkoholfunktion enthalten (Benz, 1969). Es könnte also sein, daß eine OH-Gruppe am Ring steht. Des weiteren erkennt man eine Ketenabspaltung vom Bruchstück m/z 153 aus, wobei das Bruchstück m/z 111 entsteht. Diese Abspaltung deutet eine CH_2CO -Gruppe im Ring an.

Aus diesen Strukturelementen ergibt sich für das Molekül die möglichen molekularen Zusammensetzungen: $C_{15}H_{26}O_2$, $C_{14}H_{22}O_3$, $C_{15}H_{26}O_2$ oder $C_{16}H_{30}O$.

Um das Molekulargewicht zu bestimmen wurde ein Massenspektrum mit chemischer Ionisation durch Methan angefertigt.

Abb.32 zeigt das Massenspektrum der Verbindung 5 der Neutralfraktion, welches mit chemischer Ionisation durch Methan angefertigt wurde. Bei chemischer Ionisation mit Methan werden keine Molekülionen angezeigt, sondern die größten Bruchstücke entsprechen dem Ion $(M + 1)^+$ (Seibl, 1974). Bei diesem Massenspektrum ist das größte Fragment 239, folgedessen muß das Molekulargewicht dieser Verbindung 238 sein. Die Bruchstücke, die sich daneben nachweisen lassen, entsprechen einer zweimaligen Wasserabspaltung. Es könnte also sein, daß zwei OH-Gruppen im Molekül vorliegen.

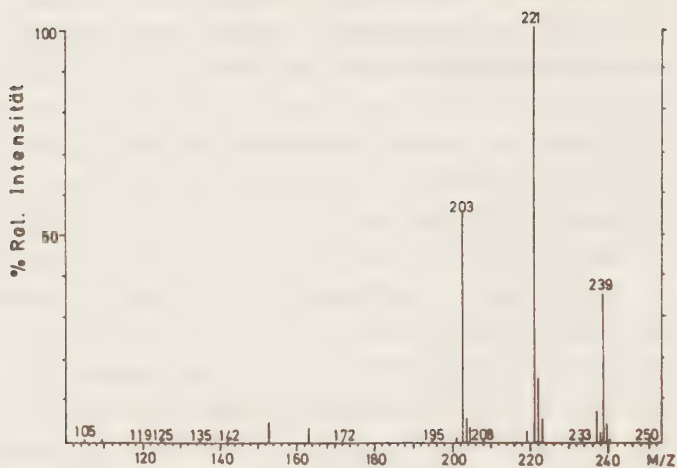


Abb.32: Massenspektrum der Verbindung 5 der Neutralfraktion, mit Methanol chemisch ionisiert.

3.1.1 Massenspektrum der isolierten Verbindung 5 nach Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid

Das Gaschromatogramm zu diesem Spektrum ist in Abb.23 dargestellt. Abb.33 zeigt das Massenspektrum der reduzierten Verbindung 5 der Neutralfraktion. Das größte Fragment ist m/z 240, was einer Erhöhung des Molekulargewichtes um 2 entspricht. Daraus ergibt sich, daß bei dieser Umsetzung eine CO-Funktion zu einer OH-Funktion reduziert wurde. Das nächste, kleinere Bruchstück entspricht $M-85$. Dies ist die gleiche Massendifferenz wie im Massenspektrum in Abb.31. Es läßt sich also sagen, daß die reduzierte CO-Gruppe nicht an der Seitenkette, sondern am Ring lokalisiert ist. Vom Bruchstück m/z 155 erfolgen wie bei dem Massenspektrum der nicht umgesetzten Verbindung 5 der Neutralfraktion zwei Zerfallsreaktionen nebeneinander. Es wird einmal Wasser abgespalten, wobei die Massenerhöhung um 2 erhalten bleibt. Es muß also noch eine OH-Gruppe in

der ursprünglichen Verbindung vorhanden sein, die bei dieser Zerfallsreaktion beteiligt ist. Bei der zweiten Zerfallsreaktion, die der Ketenabspaltung der Originalsubstanz entspricht, erfolgt bei diesem Umsetzungsprodukt eine Abspaltung mit einer Massendifferenz von 44 (C_2H_4O).

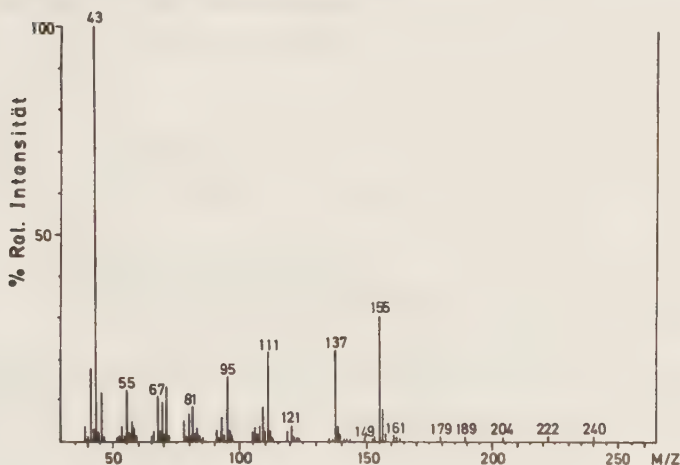


Abb.33: Massenspektrum der Verbindung 5 der Neutralfraktion nach Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid.

3.2 Massenspektren der isolierten Verbindungen der Säurefraktion nach Umsetzung mit Diazomethan

Abb. 34a und b zeigen die Massenspektren von zwei Isomeren der mit Ether bei pH 1 extrahierten Fraktion I (vgl. IV.B.2.4 Abb.16). Die Spektren unterscheiden sich durch die Intensitäten der Bruchstücke 124, 123, 109, 69 und 67. Die Massenspektren der Monoterpene (Sydow 1964; Ryhage und Sydow 1963; Willhalm et al 1964 und Sydow 1963) zeigen zwar dieselben Bruchstücke, aber die Intensitäten der Fragmente unterscheiden sich drastisch. Bei den Monoterpenen ist der Basepeak im höheren Massenbereich zu finden, während hier der Basepeak m/z 43 ist. Ein Basepeak bei 43 tritt

nur dann auf, wenn man die Monoterpenalkohole in ihre entsprechenden Acetate überführt (Massenspektren von Vergleichsverbindungen siehe III.B.2.1). Die Monoterpenacetate haben im allgemeinen das Molekulargewicht 196. Für die isomeren Verbindungen der Säurefraktion wurde das Molekulargewicht 198 bestimmt. Der Molekülpeak bei 198 ist in beiden Spektren an der Nachweisgrenze. Die Hauptfragmente lassen sich durch Abspaltung folgender Bruchstücke erklären:

1. m/z 166 Abspaltung von Methanol
2. m/z 124 aus m/z 166 unter Abspaltung von Keten
3. m/z 123 aus m/z 166 unter Abspaltung von einem Acetylradikal oder Isopropylradikal
4. m/z 109 aus m/z 124 unter Abspaltung eines Methylradikals
5. m/z 95 aus m/z 123 unter Abspaltung von CO oder Ethen
6. m/z 81 aus m/z 123 unter Abspaltung von Keten
7. m/z 43 da die Verbindungen Sauerstoff enthalten, welcher bei der Massenspektrometrie bevorzugt positive Ladungen übernimmt (Seibl, 1974), sollte es sich bei diesem Fragment um ein Acetylion handeln, das direkt aus dem Molekülion gebildet wird. Ein Isopropylion als Basepeak ist unwahrscheinlich, da in diesem Fall sauerstoffhaltige Bruchstücke zunächst als Radikale entfernt würden.



Abb.34a: Massenspektrum der isomeren Verbindung 1 der Säurefraktion.

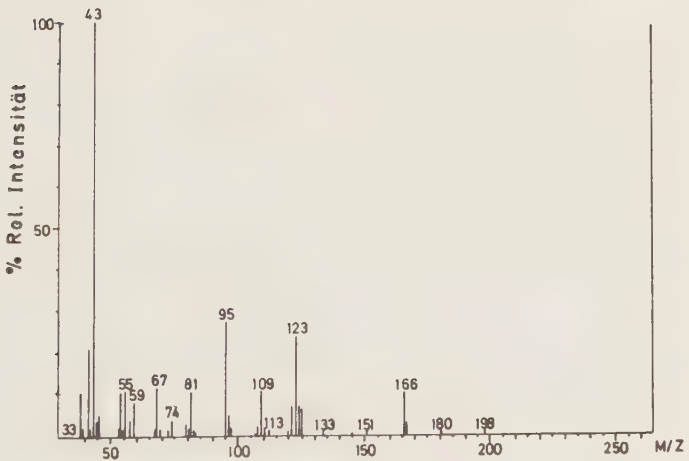


Abb.34b: Massenspektrum der isomeren Verbindung 2 der Säurefraktion.

3.2.1 Massenspektren der isolierten Verbindungen der Säurefraktion nach Derivatisierung mit BSTFA

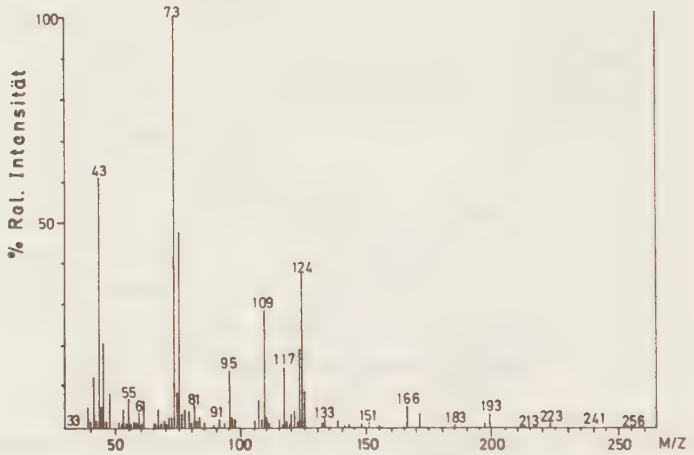


Abb.35a: Massenspektrum der isomeren Verbindung 1 der Säurefraktion nach Derivatisierung mit BSTFA

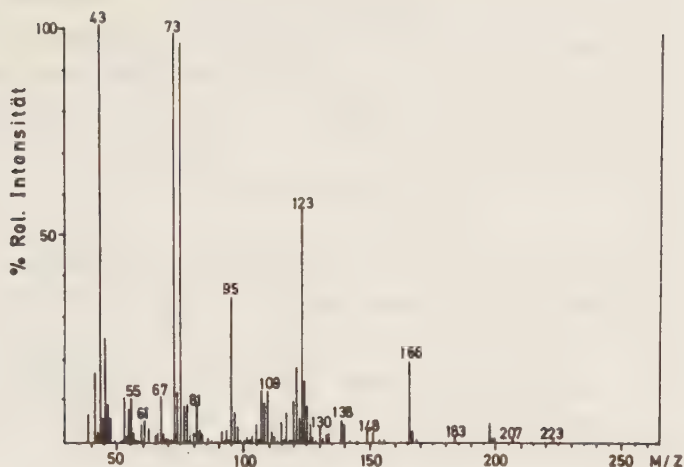


Abb.35b: Massenspektrum der isomeren Verbindung 2 der Säurefraktion nach Derivatisierung mit BSTFA

Abb.35 zeigt die beiden Massenspektren der Isomeren 1 (a) und 2 (b) der Säurefraktion nach Derivatisierung mit BSTFA. Die Massenspektren unterscheiden sich von den Spektren in Abb.34 im wesentlichen durch drei Fragmente. Es treten Bruchstücke der Massen 73, 75 und 117 auf. Die Fragmente der Massen 73 und 75 sind in allen Spektren nach Derivatisierung mit BSTFA nachzuweisen (siehe III.B.2.4). Massenspektroskopische Untersuchungen der Trimethylsilyl ether zeigen, daß neben den Bruchstücken 73 und 75 weitere signifikante Fragmente der Massen 103 und 143 auftreten (Woodgate et al, 1970; Gray et al, 1970; Dube und Kriegsmann, 1968). Der Alkoxyrest muß jedoch eine Mindestanzahl von 2 C-Atomen in einer Alkankette aufweisen. Für die Bildung von BSTFA-Derivaten funktioneller Gruppen gilt (Poole und Schuette, 1984):

Alkohole > Phenole > Carbonsäuren > Amine > Amide

Wenn eine Alkoholfunktion im Molekül vorhanden wäre, würde zunächst der Trimethylsilyl ether gebildet. Dies kann also bei den vorliegenden Isomeren

nicht der Fall sein. Das Fragment der Masse 117 ist für langkettige Dicarbonsäuren (Draffan et al, 1968) und für Hydroxycarbonsäuremethylester (Eglinton et al, 1968; Svendsen et al, 1987) beschrieben. Dieses Bruchstück sollte folgende Struktur besitzen:



Diese Verbindung muß also eine Carbonsäure sein. Die Spektren von Vergleichsverbindungen zeigen ebenfalls alle das Fragment 117 (siehe III.B.2.4).

3.2.2 Massenspektren des synthetischen cis- und trans-Thujaketosäuremethylesters

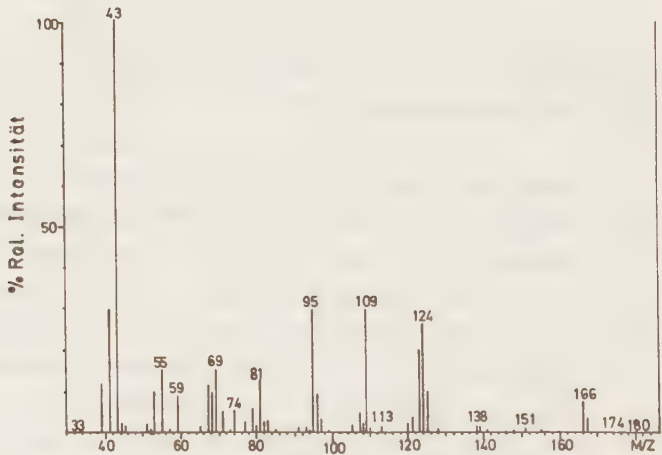


Abb.36a: Isomer des synthetischen Thujaketosäuremethylesters



Abb.36b: Isomer des synthetischen Thujaketosäuremethylesters

Abb.36a und 36b zeigt die beiden Isomeren der synthetischen Thujaketosäure. Die Massenspektren sind mit den aus *Thuja occidentalis* isolierten Isomeren (siehe Abb.34 a und b) identisch. Ein mögliches Fragmentierungsschema des Isomers der Abb.34a und 36a ist in Abb.37 dargestellt. Wahrscheinlich wird das Proton für die Methanolabspaltung aus der Isopropylgruppe geliefert. Dies müßte jedoch erst mit Hilfe der deuterierten Verbindung überprüft werden, ehe eine abschließende Aussage über die Fragmentierung gemacht werden kann. Das Isomer der Abb.34b und 36b zeigt dieselben Fragmente bis auf das Bruchstück 67, das mit einer Ethen-Abspaltung aus dem Bruchstück 95 erklärt werden kann.

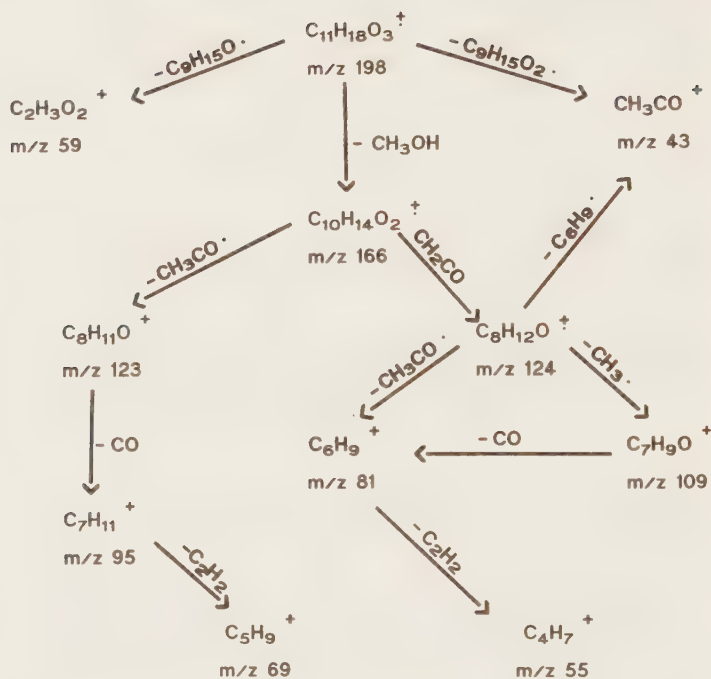


Abb.37 : Fragmentierungsschema für das Isomer in Abb.34a und 36a des Thujaketosäuremethylesters

4. Diskussion der Ergebnisse

Für die aus *Thuja occidentalis* isolierte Verbindung **5** der Neutralfraktion lassen sich nach den massenspektroskopischen Untersuchungen folgende Aussagen machen:

1. Das Molekulargewicht ist aller Wahrscheinlichkeit nach 238.
2. Die molekulare Zusammensetzung sollte dann $C_{14}H_{22}O_3$ sein (zwei OH-Funktionen und nach chemischer Ionisation eine reduzierbare CO-Funktion).

3. Die Seitenkette hat die Masse 85, wobei wahrscheinlich ein Sauerstoff enthalten ist, der nicht in einer Keto- oder Aldehydfunktion vorliegen kann. Die molekulare Zusammensetzung der Seitenkette wäre dann C_5H_9O .
4. Die cyclische Struktur sollte dann die molekulare Zusammensetzung $C_9H_{13}O_2$ besitzen. Geht man von einem Ring mit 6 C-Atomen aus, so sind am Ring entweder 3 Methylgruppen substituiert oder eine Methyl- und eine Ethylgruppe. Des weiteren sollten eine CO- und eine OH-Funktion vorhanden sein.
5. Im Ring wie in der Seitenkette müßte dann jeweils eine Doppelbindung vorhanden sein. Die Doppelbindung im Ring sollte in Stellung 3 oder 2 am Ring stehen, da so eine Ketenabspaltung über eine Retro-Diels-Alder-Reaktion erfolgen kann, die für ungesättigte cyclische Ketone beschrieben ist (Seibl, 1974).
6. Das Massenspektrum in der mit Lithiumaluminiumhydrid reduzierten Form zeigt Ähnlichkeiten zum Massenspektrum der NBS-Kartei Nr.18799. Dabei handelt es sich um 1-(1,4-Dihydroxy-2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1-yl)-But-2-en-1-on. Dieses Molekül hat jedoch das Molekulargewicht von 224.
Massenspektrum : 43 (100); 155 (35); 69 (12); 137 (10); 109 (9); 95 (8); 55 (8); 224 (2).

Vergleicht man die Aussagen unter 1. bis 6. mit Strukturen, die bereits in der Literatur beschrieben sind, so ergeben sich Ähnlichkeiten mit Derivaten der Abscisinsäure (Hedden, 1986) oder dem Jonon verwandten Strukturen (Kodoma, 1986). Für die cyclische Struktur und die Seitenkette ergeben sich folgende Möglichkeiten (Abb. 38).

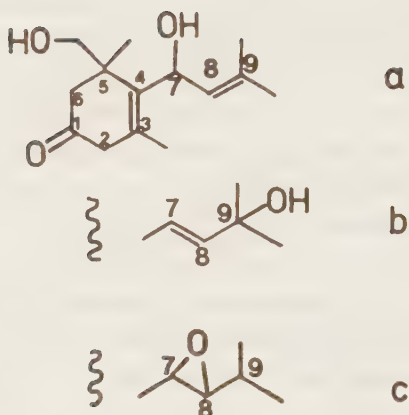


Abb.38: Mögliche Struktur der Verbindung 5 aus *Thuja occidentalis* (a) mit Varianten der Seitenkette (b und c)

Für die möglichen Anordnungen der Doppelbindung bei a spricht, daß vom Molekülpeak ausgehend keine Retro-Diels-Alder-Reaktion (RDA) erfolgt. Des weiteren würde man bei (a) im ersten Schritt eine Abspaltung der Seitenkette erwarten. Es läßt sich für diese Struktur jedoch nicht erklären, daß keine Umsetzung mit BSTFA und keine Oxidation mit Kaliumpermanganat erfolgt. Eine Oxidation würde man für alle Strukturvorschläge erwarten. Möglicherweise war die Konzentration der Verbindung 5 der Neutralfraktion zu niedrig, sodaß keine sichtbare Entfärbung auftrat. Die Seitenketten b und c würden eher erklären, daß keine Derivatisierung mit BSTFA erfolgt. Diese Annahme gilt immer unter der Voraussetzung, daß die OH-Gruppe am Ring nicht mit BSTFA reagiert.

Weitere Varianten sind denkbar, wenn die Anordnung der Doppelbindung im Ring in Stellung zwei ist. In Ausnahmefällen beobachtet man eine H-Wanderung der Seitenkette mit gleichzeitiger Umlagerung der Doppelbindung. Über einen derartigen Übergangszustand könnte die Seitenkette abgespalten

werden (Kodoma, 1984). Für eine Doppelbindung in Stellung zwei spricht die Bioaktivität der Verbindung (Milborrow, 1974). In diesem Fall könnte die Stellung der $\text{CH}_2\text{-OH}$ -Gruppe dahingehend variiert werden, daß die OH-Funktion direkt an Ring in Stellung 4 steht. Mit den unterschiedlichen Seitenketten ergeben sich weitere Möglichkeiten für die Struktur.

Es läßt sich also zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine endgültige Aussage zur Struktur der Verbindung 5 der Neutralfraktion aus *Thuja occidentalis* machen.

Für die Aufklärung der Verbindung sollte zunächst eine weitere Aufreinigung der Verbindung (siehe IV.B.2.5.3) mit Hilfe der präparativen Gaschromatographie erfolgen. Benötigt würde auf jeden Fall ein C^{13} -NMR- und ein H^1 -NMR-Spektrum, um die Struktur aufzuklären.

D. Untersuchungen von Keimungshemstoffen und Strukturanalogen an biologischen Testsystemen

1. Einleitung

Mit biologischen Testsystemen lassen sich Wirkungen einzelner Substanzen oder Substanzklassen auf ihre Aktivität untersuchen.

Untersuchungen über Struktur - Wirkungsmechanismen bei der Keimungshemmung sind bisher nicht sehr umfangreich.

Für aromatische Verbindungen gilt nach Reynolds (1978) an *Lactuca sativa* L. cv. Great Lakes, daß die Keimungshemmung abhängig von der Lipophilie der Substanz ist. Im Vergleich zur Abscisinsäure sind die aromatischen Derivate wesentlich weniger aktiv (Bittner et al, 1977).

Grandinol ist ein weiteres Beispiel für die struktur - wirkungsmechanistischen Untersuchungen von aromatischen Verbindungen.

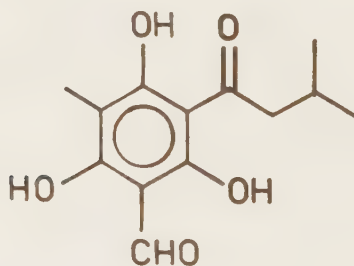


Abb.39: Struktur des Grandinols

Grandinol und Derivate wurden an *Lepidium sativum* untersucht (Bolte et al, 1985 und Yoneyama et al, 1987). Variationen der Struktur des Grandinols sind nur bedingt zulässig. Während die Aldehydfunktion durch eine Amid- oder Thioamidfunktion ausgetauscht werden kann, darf die Seitenkette nicht mehr als vier C - Atome umfassen, da sonst die Keimungshemmung reduziert

wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden im wesentlichen aliphatische und alicyclische Verbindungen untersucht.

Für einfache aliphatische Alkohole, Aldehyde und Ketone bis zu einer Kettenlänge von neun C-Atomen wurden von Reynolds (1977) an *Lactuca sativa* L.cv. Great Lakes folgende Zusammenhänge festgestellt:

1. Die Keimungshemmung steigt mit der Kettenlänge des Alkanrestes (Erhöhung des lipophilen Charakters der Verbindung).
2. Die Addition einer Alkoholfunktion bei gleicher Kettenlänge führt zu einer Erniedrigung der Keimungshemmung (Erniedrigung des lipophilen Charakters der Verbindung).
3. Allylalkohol und Acrolein zeigen gute Keimungshemmung, aber normalerweise hat der Sättigungsgrad der Verbindungen geringe Auswirkung auf die Aktivität.

Bei diesen Untersuchungen wurden die Verbindungen jeweils nur an einem Samenmaterial getestet. Unterschiedliche Samen können unterschiedliche Reservestoffe enthalten, die zur Energiegewinnung für die Keimung benutzt werden. Bei Beginn der Keimung werden also verschiedene Stoffwechselwege in Gang gesetzt. Für die folgenden Untersuchungen wurden drei Samenmaterialien unter diesem Gesichtspunkt ausgewählt.

Amaranthus caudatus ist eine dikotyledone Pflanze, deren Samen im wesentlichen Fette als Reservestoffe enthält. Für die Keimung ist deshalb eine Aktivierung der fettabbauenden Enzyme notwendig.

Lepidium sativum ist eine dikotyledone Pflanze, deren Samen 14% Öle enthält. Der Samen zeichnet sich durch eine Besonderheit aus. Gleich nach Beginn der Wasseraufnahme bildet sich ein Schleim, der aus Cellulose mit eingelagerten Polysacchariden besteht (Tyler, 1965a; 1965b). Dieser Schleim könnte entweder eine Funktion für die Bindung des Samens an die Umgebung besitzen (Ridley, 1930; erwähnt bei Wanner et al, 1977) oder er könnte eine Schutzfunktion gegenüber exogenen Stoffen durch Bindung dieser Substanzen oder Verhinderung der Diffusion erzeugen (Wanner et al, 1977).

Als drittes Samenmaterial wurde *Avena sativa* eingesetzt. *Avena sativa* ist

eine monokotyledone Pflanze, die im wesentlichen Stärke als Reservestoff enthält. Zur Energiegewinnung für die Keimung wird also die Aktivierung der stärkeabbauenden Enzyme notwendig. Da die Samen einer mechanischen und chemischen Keimungshemmung der Spelzen unterliegen (Hsiao et al., 1983; Lohaus, 1981), müssen die Hafer-Körner vor dem Test von Hand entspelzt werden.

Für den Abbau der Stärke ist die Aktivierung der α -Amylase notwendig. Als ein Beispiel für die Wirkung der Keimungshemmstoffe und ihrer Strukturanalogen auf die Energiegewinnung durch Abbau von Reservestoffen wurde die α -Amylase-Aktivität untersucht.

Die Induktion der α -Amylase-Bildung durch Gibberellinsäure ist ein Beispiel für die hormonale Funktionsweise einer Verbindung. Samen vieler Arten enthalten im lufttrockenen Zustand gebundene Gibberelline. Bei Beginn der Keimung nimmt der Gehalt an freien Gibberellinen zu, später findet auch eine Neusynthese im Embryo statt (Dörffling, 1982). Vom Embryo wird die Gibberellinsäure zur Aleuronschicht transportiert und induziert dort unter anderem die Synthese der α -Amylase (Muthukrishnan et al., 1983).

Nach einer Zusammenstellung von Baulcombe und Buffard (1983) üben die Gibberelline an der Aleuronschicht weitere Funktionen aus.

1. Die Erhöhung der Synthese an polyadenylierter mRNA und Zunahme an α -Amylase-mRNA.

2. Die Freisetzung von Enzymen aus der Aleuronschicht.

Der Mechanismus, über den die Gibberellinsäure diese Vorgänge beeinflusst, ist noch nicht geklärt. Die mögliche Beeinträchtigung der Gibberellinsäurewirkung auf die α -Amylase durch die Keimungshemmstoffe und ihre Strukturanalogen und der Einfluß der α -Amylase-Hemmung auf die Keimungshemmung an *Avena sativa* sollten untersucht werden.

2. Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus*, *Lepidium sativum* und *Avena sativa*

Für die Bestimmung der Keimungshemmung der einzelnen Verbindungen wurden jeweils drei parallele Biotests angesetzt (siehe III.C.1.2, III.C.2.2 und III.C.3.2). Für *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* wurde bis auf einzelne Ausnahmen (Abscisinsäure und Cumarin) ein Konzentrationbereich von 10^{-3} bis 10^{-4} Mol/l gewählt. Konzentrationen oberhalb von 10^{-3} Mol/l können zu einer Hemmwirkung führen, die nicht mehr im physiologischen Bereich wirkt, sondern eher durch die Konzentration der Substanz in der Lösung bedingt ist. Der Samen von *Avena sativa* ist wesentlich größer und deshalb auch unempfindlicher gegen einen Einfluß von außen. Es wurden bei diesen Bestimmungen der Keimungshemmung Konzentrationen von 10^{-2} bis 10^{-4} Mol/l eingesetzt. Wie bei den anderen Samenmaterialien ergeben sich auch hier einzelne Verbindungen, die sich als besonders aktiv erwiesen.

Die prozentuale Keimungshemmung der Verdünnungsreihen sind im Anhang aufgeführt. Um die Keimungshemmung miteinander vergleichen zu können, wurde aus den gemittelten prozentualen Werten über eine Ausgleichsgerade die molare Konzentration für 50% Keimungshemmung (KH_{50}) bestimmt. Da bei einem Teil der Verbindungen die Hemmwirkungen bei der höchsten Konzentration unter 50% lagen, wurden die Ergebnisse auf 50% Hemmwirkung extrapoliert. In allen folgenden Diagrammen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit der Logarithmus von $(1/KH_{50})$ aufgetragen.

2.1 Parasorbinsäure und Strukturanaloge

Abb.40 zeigt die Parasorbinsäure (1) und die ausgewählten Strukturanalogen. Durch Entfernen der Methylgruppe aus (1) und der Doppelbindung im Ring erhält man δ -Valerolacton (2), und durch weiteren Austausch des Sauerstoffatoms das δ -Valerolactam (3). Zusätzlich zu diesen Verbindungen wurden Angelica- (4) und Mevalonsäurelacton (5) eingesetzt, um zu prüfen, ob die Doppelbindung und Größe des Rings wichtig für die physiologische Wirkung der Parasorbinsäure sind. Die Verbindungen (1 bis 5) sind nicht planare, cyclische Verbindungen. Führt man eine weitere Doppelbindung ein, sind die Atome im Ringsystem planar angeordnet. Zu diesen Strukturanalogen gehören 2-H-Pyran-2-on (6), 2-H-Pyran-4-on (7), Cumalinsäure (8) und Cumalinsäuremethylester (9). Im Fall der Verbindungen (8) und (9) sollte untersucht werden, ob das Einfügen einer Säurefunktion zu einer Veränderung der physiologischen Wirkung führt. Die weiteren Strukturanalogen in Abb.40 sind ebenfalls planare Strukturen, die als Hydroxycimtsäurederivate anzusehen sind. Cumarin (10) ist ein bereits beschriebener Keimungshemmstoff (Groß, 1980). 10 unterscheidet sich von 6 durch Substitution eines Benzolringes in Stellung 5 und 6, wodurch die Verbindung unpolarer als 6 ist. Cumarin-3-carbonsäure (11) und Cumarin-3-carbonsäuremethylester (12) tragen im Vergleich zu 10 eine Säurefunktion, die möglicherweise Einwirkungen auf die Wirksamkeit als Keimungshemmstoff zeigen könnte.

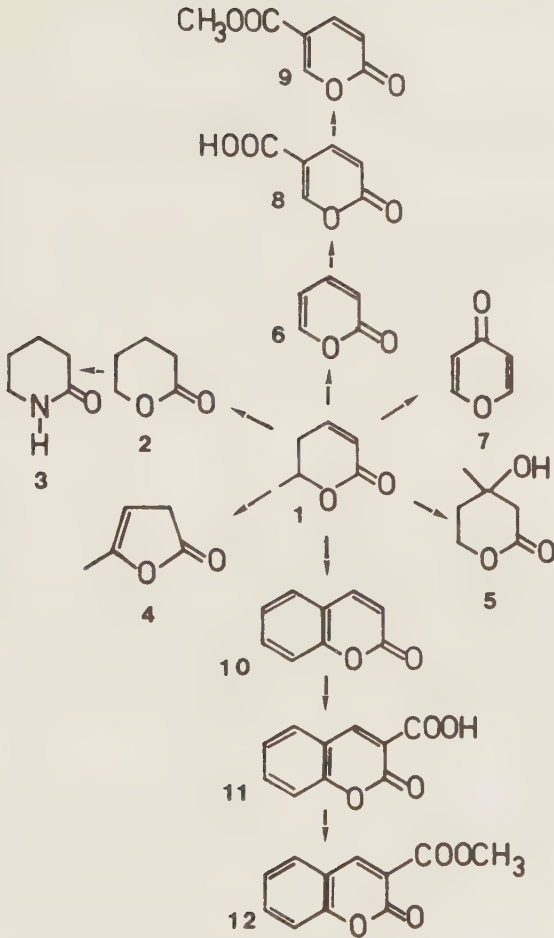


Abb.40: Parasorbinsäure und Strukturanaloge. Parasorbinsäure (1), δ-Valerolacton (2), δ-Valerolactam (3), Angelicalacton (4), Mevalonsäurelacton (5), 2-H-Pyran-2-on (6), 2-H-Pyran-4-on (7), Cumalinsäure (8), Cumalinsäuremethylester (9), Cumarin (10), Cumarin-3-carbonsäure (11) und Cumarin-3-carbonsäuremethylester (12).

Tab.21 : Keimungshemmung von Parasorbinsäure und Strukturanalogen . Vergleich an *Amaranthus caudatus* (a), *Lepidium sativum* (b) und *Avena sativa* (c) .

Nr	Verbindung	Konzentration für 50% Keimungshemmung (KH_{50}) x 10^{-3} [Mol / l]		
		a	b	c
1	Parasorbinsäure	0,39	1,10	0,43
2	δ -Valerolacton	1,77	—	5,15
3	δ -Valerolactam	2,79	2,50	8,61
4	Angelicalacton	15,50	—	—
5	Mevalonsäurelacton	2,04	—	60,90
6	2-H-Pyran-2-on	0,79	—	11,60
7	2-H-Pyran-4-on	1,41	—	6,94
8	Cumalinsäure	—	0,94	4,59
9	Cumalinsäuremethylester	0,47	0,94	5,28
10	Cumarin	0,09	0,09	0,05
11	Cumarin-3-carbonsäure	0,17	0,55	3,74
12	Cumarin-3-carbonsäure- methylester	0,19	0,364	2,780

Tab.21 zeigt den Vergleich der Konzentrationen für eine 50% ige Keimungshemmung der Parasorbinsäure und ihrer Strukturanalogen . Einige Verbindungen erzeugen an einem oder zwei Samenmaterialien bei 10^{-3} Mol/l (*Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum*) bzw. 10^{-2} Mol/l (bei *Avena sativa*) keine Keimungshemmung mehr . An *Amaranthus caudatus* ist dies bei einer Verbindung der Fall (8) . Bei *Lepidium sativum* beobachtet man ein entsprechendes Verhalten an 5 Strukturen (2,4,5,6 und 7) .

4 zeigt an allen drei Samenmaterialien eine schlechte bzw. keine Keimungshemmung .

Diese Verbindung hat eine γ -Lacton-Struktur . Die Verkleinerung des Rin-

ges und die Änderung der Stellung der Doppelbindung führt zu einer Verschlechterung der Keimungshemmung.

Wichtig für die Bioaktivität von 1 ist die Doppelbindung im Ring. Das wird im Vergleich der Verbindungen 1, 2 und 5 deutlich.

Der Austausch des Sauerstoffatoms im Ring gegen ein Stickstoffatom bewirkt eine Erhöhung der Bioaktivität an *Lepidium sativum* und eine Erniedrigung an *Amaranthus caudatus* (2 und 3).

Um weitere Gemeinsamkeiten und Unterschiede deutlicher hervorzuheben, wurde von den KH_{50} -Werten der Logarithmus des Kehrwertes aufgetragen. In den Abbildungen entspricht dadurch eine höhere Säule einer größeren Hemmaktivität. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden charakteristische Verbindungen repräsentativ ausgewählt.

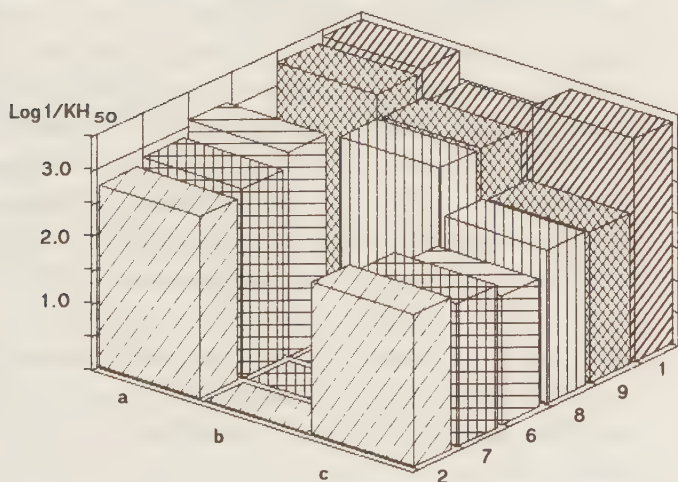


Abb.41 : $\text{Log}(1/KH_{50})$ an *Amaranthus caudatus* (a), *Lepidium sativum* (b) und *Avena sativa* (c). Vergleich von δ -Valerolacton (2), 2-H-Pyran-4-on (7), 2-H-Pyran-2-on (6), Cumalinsäure (8), Cumalinsäuremethylester (9) und Parasorbinsäure (1).

Abb.41 zeigt den Vergleich der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* (a), *Lepidium sativum* (b) und *Avena sativa* (c) der Parasorbinsäure (1) mit einigen der Strukturanalogen (2, 6, 7, 8, 9).

Die Verbindungen 2, 6 und 7 unterscheiden sich durch den Sättigungsgrad des Ringes. 6 besitzt zwei Doppelbindungen im Ring und ist dadurch planar angeordnet, während 2 nicht planar ist. 7 besitzt wie 6 einen ebenen Ring, jedoch ist bei diesem Molekül die Ketofunktion in Stellung 4. Alle drei Verbindungen zeigen an *Amaranthus caudatus* die höhere, an *Avena sativa* eine niedrigere und an *Lepidium sativum* keine Keimungshemmung. An *Amaranthus caudatus* wirkt sich die planare Anordnung des Ringes positiv, an *Avena sativa* negativ auf die Bioaktivität aus.

Verbindung 1 stellt unter dem Aspekt des sterischen Aufbaus des Ringes einen Übergang von 2 nach 6 dar. Sie sollte sich in ihrer Aktivität zwischen 2 und 6 einordnen lassen. Dies ist jedoch nicht der Fall. 1 bewirkt im Vergleich zu 2 und 6 an allen eingesetzten Samenmaterialien eine höhere Keimungshemmung. Besonders auffällig ist die Aktivität an *Lepidium sativum*. Dieser Unterschied läßt sich deshalb nur mit der Methylgruppe am Ring erklären.

Die Verbindungen 8 und 9 sind substituierte Derivate von 6. Vergleicht man 6 mit 8, so ergibt sich folgendes: Die höhere Polarität bei 8 gegenüber 6 führt zu einer Erniedrigung der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* und zu einer Erhöhung der Bioaktivität an *Lepidium sativum*.

Die Substanz 9 ist der Methylester von 8. Dies bedeutet, daß 9 weniger polar ist als 8. Bei *Amaranthus caudatus* führt die weniger polare Verbindung zu einer höheren Aktivität, während die Keimungshemmung an *Lepidium sativum* und *Avena sativa* minimale Unterschiede zeigt.

Betrachtet man die Verbindungen 6, 8 und 9, muß für die physiologische Wirkung an *Lepidium sativum* und *Avena sativa* die Substitution am Ring wichtig sein. Im Gegensatz dazu ist bei *Amaranthus caudatus* die Polarität der Verbindungen das wesentliche Kriterium für die Aktivität.

Vergleicht man die Verbindungen 6 und 8 bis 12, ergibt sich folgendes Diagramm (Abb.42):

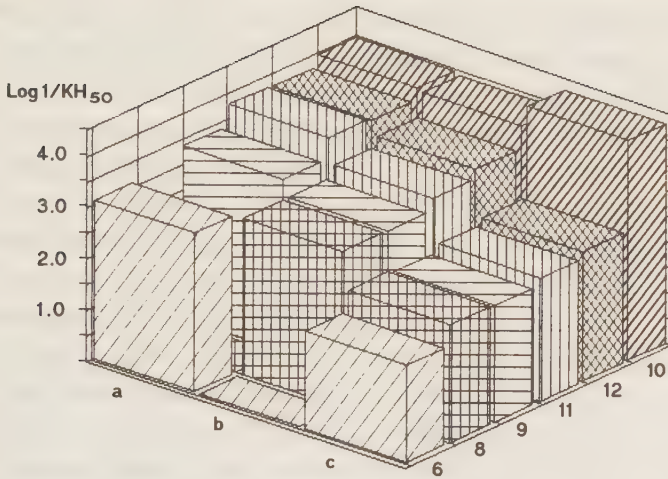


Abb.42: $\text{Log}(1/KH_{50})$ an *Amaranthus caudatus* (a), *Lepidium sativum* (b) und *Avena sativa* (c). Vergleich von 2-H-Pyran-2-on (6), Cumalinsäure (8), Cumalinsäuremethylester (9), Cumarin-3-carbonsäure (11), Cumarin-3-carbonsäuremethylester (12) und Cumarin (10).

Die Strukturen 10, 11 und 12 lassen sich von 6 ableiten. 10 ist an allen drei Samenmaterialien die aktivste Verbindung. Vergleicht man die Strukturen 6 und 10, so ergibt die Erniedrigung der Polarität eine Erhöhung der Keimungshemmung bei allen Samenmaterialien. Die hohe Aktivität der Verbindung 10 an *Avena sativa* ist besonders auffällig.

10, 11 und 12 stellen wie 6, 8 und 9 Analoge dar, die aus einer cyclischen Verbindung (6 und 10), ihren substituierten Carbonsäuren (8 und 11) und Methylestern (9 und 12) bestehen. Für die Verbindungen 10, 11 und 12 sollte man also ein ähnliches Verhalten an den drei Samenmaterialien wie bei 6, 8 und 9 erwarten. Dies ist jedoch nicht der Fall. 11 müßte demnach an *Amaranthus caudatus* und 10 an *Lepidium sativum* und *Avena sativa* eine niedrigere Bioaktivität zeigen. Dies bedeutet aber auch, daß unterschiedliche physiologische Wirkungsweisen der Verbindungen 6, 8 und 9 im Vergleich zu 10, 11 und 12 vorliegen.

Die Substitution von 11 und 12 führt gegenüber 10 zu einer besonders starken Erniedrigung der Keimungshemmung an *Avena sativa*. Dies kann bedeuten, daß 10 eine spezifische physiologische Wirkung an *Avena sativa* besitzt, die durch die Substitution aufgehoben wird. Durch Einfügen der Carbonsäurefunktion ist die sterische Anordnung im Molekül stark geändert, und darum kann keine Bindung an einem reaktiven Zentrum des Samens erfolgen.

2.2 Isopropyläpfelsäuredimethylester und Strukturanaloge

Da für die Durchführung aller biologischen Untersuchungen nicht genügend Isopropyläpfelsäure zur Testung in freier Säure- und Methylesterform zur Verfügung stand, wurde für die folgenden Versuche Isopropyläpfelsäuredimethylester eingesetzt, da er eher mit den Strukturanalogen, die ebenfalls in Esterform vorlagen, zu vergleichen ist.

Abb.4.3 zeigt den Isopropyläpfelsäuredimethylester (13) und die untersuchten Strukturanalogen. Isopropyläpfelsäuredimethylester besitzt drei funktionelle Reste (zwei Methylester- und eine Alkoholgruppe) und einen Alkylrest (Isopropylgruppe). Bei den Strukturanalogen wurden diese Gruppen gegen andere ausgetauscht. Der Alkylrest bei allen Strukturanalogen besteht aus einem langkettigen Alkan. Wird die Alkoholgruppe gegen eine Säurefunktion und die Stellung des Alkylrestes (von Stellung 2 nach Stellung 3) ausgetauscht, so erhält man Methyl-2,3-di(methoxycarbonyl)-nonanoat (14) und Methyl-2,3-di(methoxycarbonyl)-undecanoat (15).

Die weiteren Strukturanalogen entsprechen einer Teilstruktur der Isopropyläpfelsäure. Sie enthalten zwei funktionelle Gruppen, die in der Stellung einer Säure- und der Alkoholfunktion der Isopropyläpfelsäure entsprechen. Auch bei diesen Analogen wurde die Isopropylgruppe durch einen langkettigen Alkylrest ersetzt. Tauscht man die Alkoholfunktion gegen eine Cyanogruppe aus, ergeben sich Methyl-2-cyanononanoat (16), Methyl-2-cyanoundecanoat (17).

Wird die Alkoholfunktion durch eine Säuregruppe ersetzt, erhält man Methyl-2-methoxycarbonylnonanoat (18) und Methyl-2-methoxycarbonylundecanoat (19).

Werden die beiden Säurefunktionen der Verbindungen 18 und 19 reduziert, erhält man als zwei weitere Analoge 2-Hydroxymethylnonanol (20) und 2-Hydroxymethylundecanol (21).

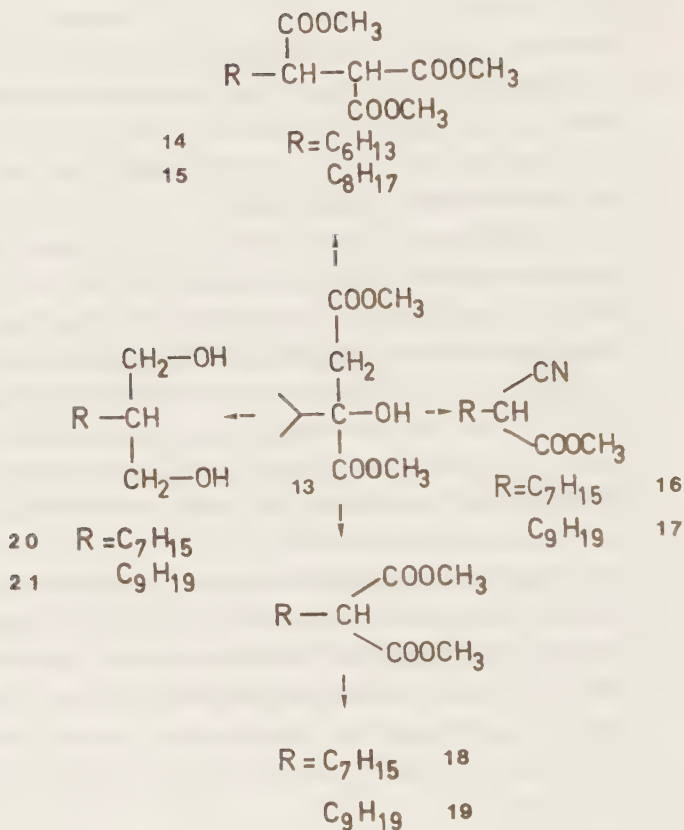


Abb.43: Isopropyläpfelsäuredimethylester und Strukturanaloge. Isopropyl-äpfelsäuredimethylester (13), Methyl-2,3-di(methoxycarbonyl)-nonanoat (14), Methyl-2,3-di(methoxycarbonyl)-undecanoat (15), Methyl-2-cyanononanoat (16), Methyl-2-cyanoundecanoat (17), Methyl-2-methoxycarbonylnonanoat (18), Methyl-2-methoxycarbonylundecanoat (19), 2-Hydroxymethylnonanol (20) und 2-Hydroxymethylundecanol (21).

Die Bestimmung der Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* sowie einiger Verbindungen an *Avena sativa* wurden von Kohlmeier (1987) durchgeführt. Aus den von ihm bestimmten Verdünnungsreihen wurden die Werte für KH_{50} berechnet und mit Isopropyläpfelsäuredimethylester verglichen.

Tab.22: Keimungshemmung von Isopropyläpfelsäuredimethylester und Strukturanalogen. Vergleich an *Amaranthus caudatus* (a), *Lepidium sativum* (b) und *Avena sativa* (c)

Nr	Verbindung	Konzentration für 50% Keimungshemmung (KH_{50}) x 10^{-3} [Mol/l]		
		a	b	c
13	Isopropyläpfelsäuredimethylester	0,30	0,23	6,95
14	Methyl-2,3-di(methoxycarbonyl)-nonanoat	0,28*	0,69*	2,72
15	Methyl-2,3-di(methoxycarbonyl)-undecanoat	0,36*	1,00*	12,09
16	Methyl-2-cyanononanoat	0,06*	0,26*	2,34
17	Methyl-2-cyanoundecanoat	0,04*	0,23*	4,07*
18	Methyl-2-methoxycarbonylnonanoat	0,28*	0,30*	3,97
19	Methyl-2-methoxycarbonylundecanoat	0,37*	0,62*	7,19*
20	2-Hydroxymethylnonanol	0,43*	0,90*	1,97
21	2-Hydroxymethylundecanol	0,42*	0,80*	2,53*

* Berechnete Werte aus Verdünnungsreihen von Kohlmeier (1987).

Tab.22 zeigt den Vergleich der Konzentrationen für die 50% ige Keimungshemmung des Isopropyläpfelsäuredimethylesters mit den Strukturanalogen an *Amaranthus caudatus* (a), *Lepidium sativum* (b) und *Avena sativa* (c). Die

Strukturanalogen, die sich jeweils um eine C_2H_4 -Einheit unterscheiden, zeigen geringe Unterschiede bei der Keimungshemmung an den entsprechenden Samen. Die einzige große Aktivitätsdifferenz ergibt sich an *Avena sativa* bei den Verbindungen 14 und 15. Für die graphische Darstellung wurde je eines der Strukturanalogen ausgewählt.

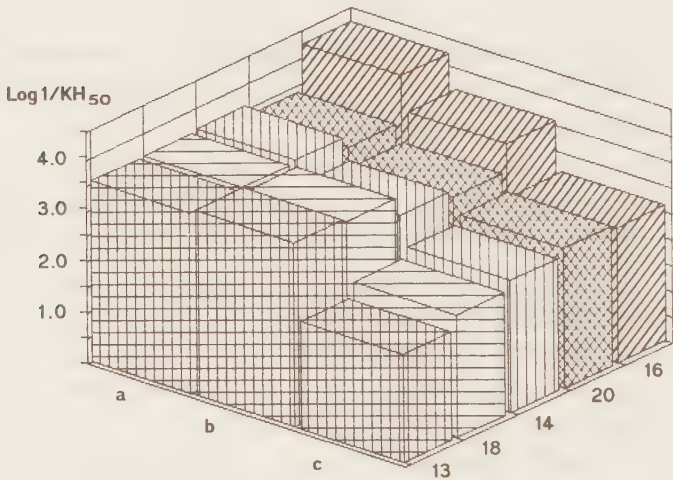


Abb.44: Log (1/KH₅₀) an *Amaranthus caudatus* (a), *Lepidium sativum* (b) und *Avena sativa* (c). Vergleich von Isopropyläpfelsäuredimethylester (13), Methyl-2-methoxycarboxylnonanoat (18), Methyl-2,3-di(methoxycarboxyl)-nonanoat (14), 2-Hydroxymethylnonanol (20) und Methyl-2-cyanononanoat (16).

Abb.44 zeigt den Vergleich des Log (1/KH₅₀) an *Amaranthus caudatus* (a), *Lepidium sativum* (b) und *Avena sativa* (c) des Isopropyläpfelsäuredimethylesters (13) mit den Strukturanalogen 14, 16, 18 und 20. Die Verbindungen 14, 16, 18 und 20 besitzen dieselbe Kettenlänge des Alkyl-

restes . Der Einfluß auf die Keimungshemmung ist deshalb auf die funktionellen Gruppen zurückzuführen . Die Untersuchung der Keimungshemmung dieser Verbindungen an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* wurden von Kohlmeyer (1987) durchgeführt . Er fand für diese Substanzklasse folgende Abhängigkeiten der Bioaktivität :

1. Ein Alkanrest ist notwendig für die keimungshemmende Wirkung dieser Verbindungen .
2. Der Vergleich der freien Säuren mit den entsprechenden Methylesterverbindungen zeigt , daß die Ester eine wesentlich höhere Aktivität an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* hervorrufen .
3. Der Unterschied der Bioaktivität zwischen den Verbindungen mit einem C-9 oder C-11-Alkanrest ist gering .

Betrachtet man die Verbindungen **13** und **18** , so ergibt sich an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* eine nahezu identische Keimungshemmung , während an *Avena sativa* **18** eine höhere Aktivität besitzt . Für die Verbindungen **14** und **18** wurde eine Abhängigkeit der Bioaktivität von der Kettenlänge an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* nachgewiesen (Kohlmeyer , 1987; Adamek unveröffentlicht) . Für die Analogen von **14** mit unterschiedlicher Kettenlänge ergibt sich das Optimum der Wirksamkeit bei Alkanresten mit neun und elf C-Atomen . Man sollte also erwarten , daß die Keimungshemmung von **13** an den beiden Samen niedriger ist . Dies läßt auf eine unterschiedliche physiologische Wirkungsweise , der Verbindungen **13** einerseits und andererseits **14** und **18** schließen .

Beim Vergleich der Keimungshemmung an *Avena sativa* ergibt **20** die höchste Aktivität . **20** zeigt an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* jeweils die niedrigste Keimungshemmung . Es muß also ein anderer Wirkungsmechanismus von **20** bei *Avena sativa* vorliegen .

2.3 Thujaketosäure und Strukturanaloge

Abb.45 zeigt die Thujaketosäure (22) und ihre Strukturanalogen . Thujaketosäure ist in die Substanzklasse der Cyclopropanderivate einzuordnen . Durch Veresterung mit Diazomethan erhält man den Thujaketosäuremethylester (23) . Alle anderen Strukturanalogen sind Cyclopropandicarbonsäurederivate , die man durch Austausch der Acetylfunktion der Thujaketosäure gegen eine Säurefunktion , direkte Substitution der vorhandenen Säurefunktion an den Cyclopropanring und Entfernen der Isopropylgruppe erhält . Der Cyclopropanring ist planar . Die Säuregruppen können also in E - oder Z - Form vorliegen . Daraus ergeben sich die Verbindungen Z - Cyclopropan - 1,2 - dicarbonsäuredimethylester (24) und E - Cyclopropan - 1,2 - dicarbonsäuredimethylester (25) . Die weiteren Analogen sind substituierte Cyclopropandicarbonsäuredimethylesterderivate . Durch Substitution einer Methylgruppe in Stellung eins am Ring erhält man den 1 - Methyl - cyclopropan - 1,2 - dicarbonsäuredimethylester (26) . Das andere Derivat ist in Stellung drei mit einer Methylengruppe substituiert . Es ist die Verbindung 3 - Methylen - cyclopropan - 1,2 - dicarbonsäuredimethylester (27) .

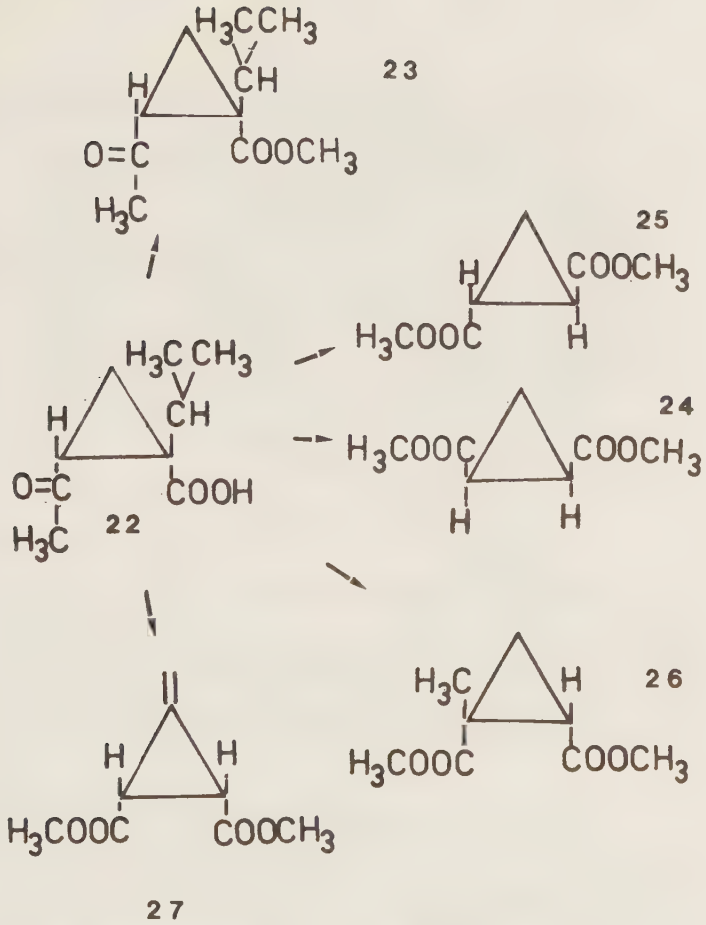


Abb.45: Thujaketosäure und Strukturanaloge. Thujaketosäure (22), Thujaketosäuremethylester (23), Z-Cyclopropan-1,2-dicarbonsäuredimethylester (24), E-Cyclopropan-1,2-dicarbonsäuredimethylester (25), 1-Methyl-cyclopropan-1,2-dicarbonsäuredimethylester (26) und 3-Methylen-cyclopropan-1,2-dicarbonsäuredimethylester (27).

Aus den Verdünnungsreihen der Keimungshemmtests wurden die Konzentrationen für 50% Keimungshemmung bestimmt. Sie sind in Tab.23 aufgelistet.

Tab.23: Vergleich der Keimungshemmung der Thujaketosäure mit Strukturanalogen an *Amaranthus caudatus* (a), *Lepidium sativum* (b) und *Avena sativa* (c).

Nr	Verbindung	Konzentration für 50% Keimungshemmung (KH_{50}) x 10^{-3} [Mol/l]		
		a	b	c
22	Thujaketosäure	0,55	1,10	5,17
23	Thujaketosäuremethylester	0,38	0,32	3,89
24	Z - Cyclopropan - 1,2 - dicarbonsäure - dimethylester	0,53	0,81	1,65
25	E - Cyclopropan - 1,2 - dicarbonsäure - dimethylester	1,01	1,17	3,75
26	1 - Methyl - cyclopropan - 1,2 - dicarbonsäuredimethylester	1,25	0,48	2,35
27	3 - Methylen - cyclopropan - 1,2 - dicarbonsäuredimethylester	0,19	—	4,71

Tab.23 zeigt den Vergleich der Konzentration für die 50% ige Keimungshemmung der Thujaketosäure mit Strukturanalogen an *Amaranthus caudatus* (a), *Lepidium sativum* (b) und *Avena sativa* (c).

Die Verbindung 27 zeigt bei einer Konzentration von 10^{-3} Mol/l an *Lepidium sativum* keine Keimungshemmung, während an *Amaranthus caudatus* die höchste Aktivität aller getesteten Substanzen erzielt wird. Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede deutlicher zu dokumentieren, wurde von den Substanzen der Log ($1/KH_{50}$) an den einzelnen Samenmaterialien berechnet

und graphisch aufgetragen (Abb.46).

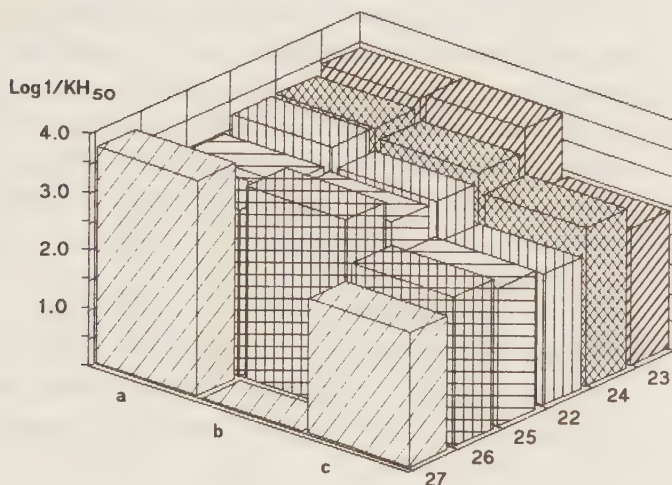


Abb.46 : Log (1/KH₅₀) an *Amaranthus caudatus* (a), *Lepidium sativum* (b) und *Avena sativa* (c). Vergleich von 3-Methylen-cyclopropan-1,2-dicarbonsäuredimethylester (27), 1-Methyl-cyclopropan-1,2-dicarbonsäuredimethylester (26), E-Cyclopropan-1,2-dicarbonsäuredimethylester (25), Thujaketosäure (22), Z-Cyclopropan-1,2-dicarbonsäuredimethylester (24), und Thujaketosäuremethylester (23).

Die Verbindungen 24 und 25 sind das E- (25) und Z-Isomere (24) des Cyclopropan-1,2-dicarbonsäuredimethylesters. Der Vergleich der Keimungshemmung dieser beiden Strukturen zeigt, daß die Z-Form bei allen Samenmaterialien zu einer Erhöhung der Bioaktivität führt.

Bei allen anderen getesteten Substanzen (22, 23, 26 und 27) handelt es sich um Gemische der E- bzw Z-Isomeren.

Betrachtet man die Verbindungen 22 und 23, so ergibt sich, daß die Methylesterform bei allen Samenmaterialien eine Erhöhung der Keimungshemmung

bewirkt. An *Lepidium sativum* zeigt sich dieser Unterschied deutlicher als an *Amaranthus caudatus* und *Avena sativa*.

Die Struktur **26** ist die mit einer Methylgruppe in Stellung eins substituierte Form von **24** und **25**. Die Methylgruppe bewirkt an *Amaranthus caudatus* eine Erniedrigung der Keimungshemmung. An *Lepidium sativum* wird die Aktivität gegenüber **24** und **25** erhöht. Bei *Avena sativa* liegt die Konzentration der keimungshemmenden Wirkung von **26** zwischen **24** und **25**. Dieses unterschiedliche Verhalten an den einzelnen Samenmaterialien läßt darauf schließen, daß verschiedene physiologische Wirkungen an den einzelnen Samen vorliegen.

Entsprechendes gilt für Verbindung **27**, die ein in Stellung drei mit einer Methylengruppe substituiertes Derivat von **24** und **25** ist. Durch eine derartige Substitution wird an *Amaranthus caudatus* eine höhere Bioaktivität erzielt. Im Gegensatz dazu wird die Keimungshemmung an *Lepidium sativum* und *Avena sativa* erniedrigt.

2.4 Monoterpene

Abb.47 zeigt die getesteten Monoterpene. Drei Verbindungen gehören in die Substanzklasse der Ketone. Es sind dies Fenchon (**28**), Thujon (**29**) und Campher (**30**).

Alle anderen untersuchten Monoterpene sind Alkohole, die sich in drei Gruppen aufteilen lassen. Bei der ersten handelt es sich um die cyclischen Monoterpenalkohole Menthol (**31**), Thujylalkohol (**32**), Borneol (**33**), Isoborneol (**34**), Terpinen-4-ol (**35**) und α -Terpineol (**36**).

Zur zweiten Gruppe der aromatischen Monoterpenalkohole zählen Thymol (**37**) und Carvacrol (**38**).

Die dritte Gruppe sind die offenkettigen Monoterpenalkohole Geraniol (**39**) und Citronellol (**40**).

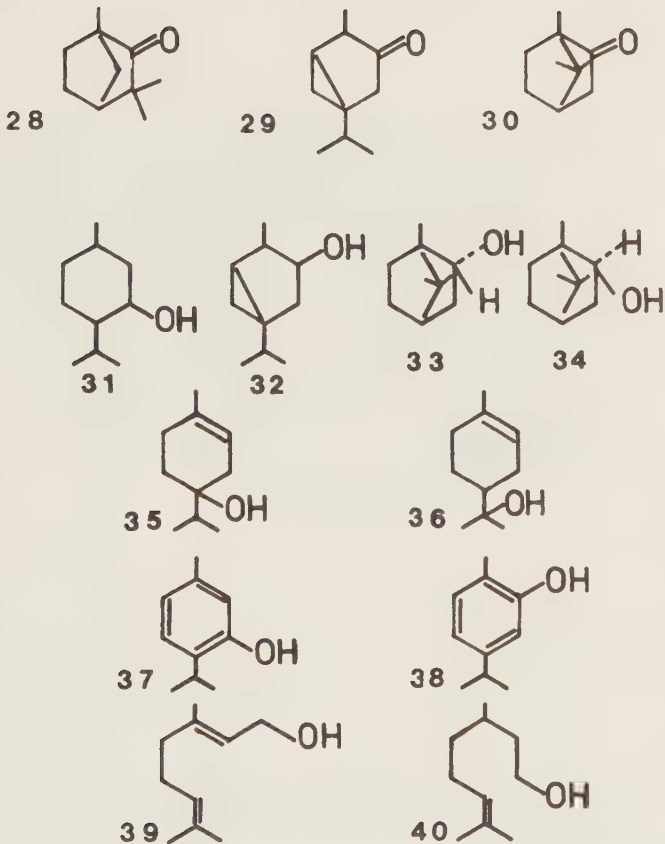


Abb.47: Monoterpene. Fenchon (28), Thujon (29), Campher (30), Menthhol (31), Thujylalkohol (32), Borneol (33), Isoborneol (34), Terpinen-4-ol (35), α -Terpineol (36), Thymol (37), Carvacrol (38), Geraniol (39) und Citronellol (40).

Die Keimungshemmung dieser Verbindungen an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* wurden von Spraul (1987) bestimmt. Aus den Verdünnungsreihen wurden die Konzentrationen für die 50% ige Keimungshemmung (KH_{50}) berechnet und miteinander verglichen.

Tab.24: Vergleich der Keimungshemmung der Monoterpene an *Amaranthus caudatus* (a), *Lepidium sativum* (b) und *Avena sativa* (c).

Nr	Verbindung	Konzentration für 50% Keimungshemmung (KH_{50}) $\times 10^{-3}$ [Mol/l]		
		a	b	c
28	Fenchon	1,05 *	1,70 *	35,60
29	Thujon (α und β)	0,65 *	1,03 *	10,01
30	Campher	0,92 *	1,02 *	5,37
31	Menthol	0,46 *	0,63 *	4,96
32	Thujylalkohol	0,32 *	0,47 *	0,46
33	Borneol	0,50	0,70	3,20
34	Isoborneol	0,10 *	0,54 *	1,82
35	Terpinen - 4 - ol	0,38 *	1,48 *	1,85
36	α - Terpeneol	0,45 *	1,01 *	1,80
37	Thymol	0,40 *	0,40 *	1,95
38	Carvacrol	0,28 *	0,69 *	1,70
39	Geraniol	0,11 *	0,66 *	2,57
40	Citronellol	0,18 *	0,49 *	1,94

* Berechnete Werte aus Verdünnungsreihen von Spraul (1987).

Tab.24 zeigt den Vergleich der Konzentrationen für die 50% ige Keimungshemmung der Monoterpene an *Amaranthus caudatus* (a), *Lepidium sativum* (b) und *Avena sativa* (c).

Bis auf Thujylalkohol zeigen alle untersuchten Monoterpenketone und Mono-

terpenalkohole das gleiche Verhalten an den Samen. Die größte Keimungshemmung wird an *Amaranthus caudatus* und die niedrigste an *Avena sativa* bewirkt. Die Aktivität der Ketone ist im allgemeinen geringer als die der Alkohole.

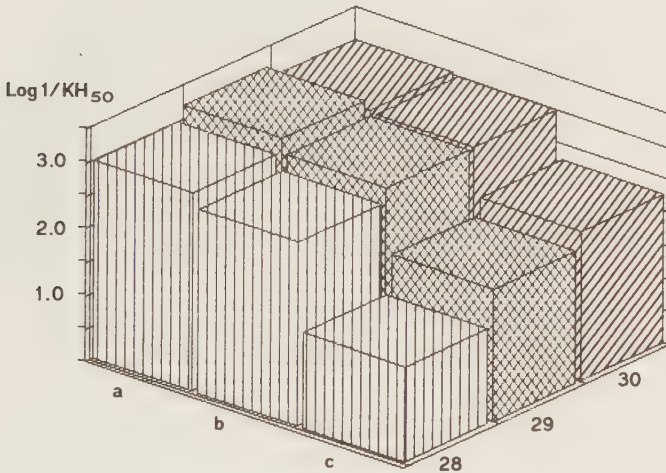


Abb.48: $\text{Log}(1/\text{KH}_{50})$ an *Amaranthus caudatus* (a), *Lepidium sativum* (b) und *Avena sativa* (c). Vergleich der Monoterpenketone Fenchon (28), Thujon (29) und Campher (30).

Abb.48 zeigt den Vergleich des $\text{Log}(1/\text{KH}_{50})$ der Monoterpenketone an *Amaranthus caudatus* (a), *Lepidium sativum* (b) und *Avena sativa* (c). Die Monoterpenketone 28 und 30 zeigen an *Amaranthus caudatus* dieselbe Bioaktivität. An *Lepidium sativum* und *Avena sativa* ist die Keimungshemmung von 28 jeweils niedriger als die von 30. Die Verbindungen unterscheiden sich durch die Stellung zweier Methylgruppen am cyclischen Ringsystem. Die Ketofunktion könnte der mögliche Bindungspartner mit einem reaktiven Zentrum sein. Bei 28 ist die Ketogruppe durch die Methylgruppen in

Nachbarstellung stärker abgeschirmt. Dies könnte die niedrigere Aktivität an *Lepidium sativum* und *Avena sativa* erklären.

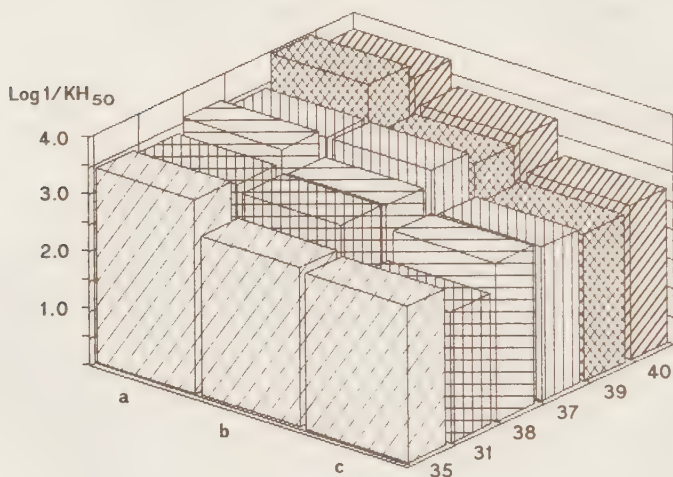


Abb.49: Log (1/KH₅₀) an *Amaranthus caudatus* (a), *Lepidium sativum* (b) und *Avena sativa* (c). Vergleich der Monoterpenalkohole Terpinen-4-ol (35), Menthol (31), Carvacrol (38), Thymol (37), Geraniol (39) und Citronellol (40).

Abb.49 zeigt den Vergleich des Log (1/KH₅₀) an *Amaranthus caudatus* (a), *Lepidium sativum* (b) und *Avena sativa* (c) einiger getesteten Monoterpenalkohole.

Die aromatische Verbindung **37** zeigt bei allen Samenmaterialien eine höhere Keimungshemmung als die nicht aromatische **31**.

Die beiden aromatischen Verbindungen **37** und **38** unterscheiden sich in der Stellung der Hydroxylgruppe am Ring. Vergleicht man **37** und **38**, so ergibt

sich an *Amaranthus caudatus* und *Avena sativa* eine höhere Aktivität von **38**. An *Lepidium sativum* ist **37** die aktivere Verbindung.

Die offenkettige Struktur **39** erzeugt an *Amaranthus caudatus* eine höhere Keimungshemmung als die ebenfalls offenkettige Verbindung **40**. Beide sind aktiver als die aromatischen (**37** und **38**) und alicyclischen (**31** und **35**) Substanzen. An *Lepidium sativum* und *Avena sativa* ergibt sich im Vergleich von **39** und **40** eine größere Bioaktivität für **40**.

Im Vergleich zu **31** besitzt **35** an *Amaranthus caudatus* und *Avena sativa* die höhere und an *Lepidium sativum* die niedrigere Keimungshemmung.

2.5 Vergleich der Keimungshemmung von Abscisinsäure mit Strukturanalogen der isolierten Keimungshemmstoffe

Mit Abscisinsäure (**41**) und Abscisinsäuremethylester (**42**) wurde an *Amaranthus caudatus*, *Lepidium sativum* und *Avena sativa* die Keimungshemmung bestimmt. Aus den Verdünnungsreihen (siehe Anhang) wurden der Werte für KH_{50} berechnet. Für die graphische Darstellung im Vergleich zu vier Strukturanalogen der isolierten Keimungshemmstoffe wurde der $\log(1/KH_{50})$ verwendet.

Abb.50 zeigt den Vergleich des $\log(1/KH_{50})$ von Abscisinsäure (**41**) und Abscisinsäuremethylester (**42**) mit den Strukturanalogen der isolierten Keimungshemmstoffe (**10**, **16**, **24** und **31**) an *Amaranthus caudatus* (a), *Lepidium sativum* (b) und *Avena sativa* (c).

Die Verbindungen **10**, **16**, **24** und **31** gehören zu jeweils einer der unter IV.C.2.1 bis IV.C.2.4 untersuchten Verbindungen.

Betrachtet man **41** und **42** so ergeben sich bei *Amaranthus caudatus* größere Differenzen als bei *Lepidium sativum* und *Avena sativa*. Es ist zu erwarten, daß bei **41** und **42** die physiologische Wirkung im Samen durch die Veresterung nicht stark verändert wird, da bei *Lepidium sativum* und *Avena sativa* keine großen Differenzen auftreten. Der Unterschied bei *Amaranthus caudatus* läßt sich deshalb nur über eine verbesserte Aufnahme des lipophilen Methylesters **42** erklären. Ein ähnliches Verhalten wurde auch bei

den Verbindungen 8 und 9 (siehe Abb.41) beobachtet .

Die Strukturen 16, 24 und 31 zeigen an *Amaranthus caudatus* jeweils die höchste und an *Avena* die niedrigste Bioaktivität. Im Gegensatz dazu läßt sich bei 41 an *Lepidium sativum* die größte und an *Amaranthus caudatus* und *Avena sativa* eine fast gleich große Keimungshemmung nachweisen. *Avena sativa* reagiert nicht besonders empfindlich auf die Verbindungen 16, 24 und 31. Dies könnte aber auch ein Hinweis sein, daß 16, 24 und 31 weniger spezifisch bei der Keimung in einen Stoffwechselweg dieser Samen eingreifen .

Cumarin (10) zeigt an allen drei Samen eine ähnlich hohe Keimungshemmung. Der Aktivitätsunterschied von 10 im Vergleich zu 41 und 42 an *Avena sativa* ist nicht so groß wie der der anderen Verbindungen (16, 24 und 31) .

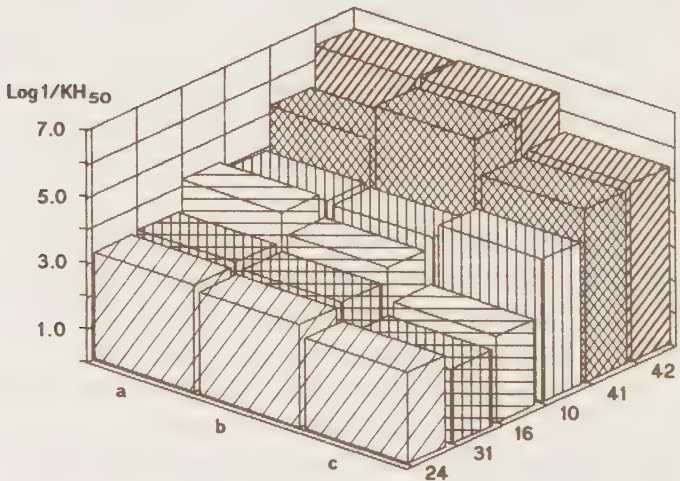


Abb.50: Log (1/KH₅₀) an *Amaranthus caudatus* (a), *Lepidium sativum* (b) und *Avena sativa* (c). Vergleich von Z-Cyclopropan-1,2- dicarbonsäuredimethylester (24), Menthol (31), Methyl-2-cyanononanoat (16), Cumarin (10), Abscisinsäure (41) und Abscisinsäuremethylester (42).

3. Untersuchungen der α -Amylase-Aktivität

3.1 Bestimmung der α -Amylase-Aktivität an ganzen Karyopsen von *Avena sativa*

Die Bestimmung der α -Amylase-Aktivität an ganzen Karyopsen erfolgte in Anlehnung an die Versuche von Kohlmeier (1987). Die Durchführung der Versuche ist unter III.C.4.1 beschrieben. Es wurde derselbe Konzentrationsbereich (10^{-2} bis 10^{-4} Mol/l) wie bei der Bestimmung der Keimungshemmung an *Avena sativa* gewählt. Da Cumarin eine Keimungshemmung an *Avena sativa* bis in den Konzentrationsbereich von 10^{-5} Mol/l zeigte, wurde bei dieser Bestimmung die Konzentration von 10^{-3} bis 10^{-5} Mol/l gewählt. Von jeder Verdünnung wurden vier Parallelproben untersucht. Aus den Verdünnungsreihen wurde über eine Ausgleichsgerade die Konzentration für 50% Hemmwirkung (AH_{50}) ermittelt. Da bis auf vier Verbindungen die Hemmwirkungen bei der höchsten Konzentration unter 50% lagen, wurden die Ergebnisse auf 50% Hemmwirkung extrapoliert. Die extrapolierten Werte können im Vergleich zu den nicht extrapolierten Werten erhöht sein. Es wurde darauf verzichtet, die Konzentration der Lösungen zu erhöhen, da dann nicht physiologische Konzentrationsbereiche erreicht werden. Die Werte für AH_{50} wurden mit der Konzentration für 50% Keimungshemmung (KH_{50}) an *Avena sativa* verglichen.

3.1.1 Parasorbinsäure und Strukturanaloge

Es wurden acht der im Keimungshemmtest an *Avena sativa* untersuchten Verbindungen in den α -Amylase-Test eingesetzt. Die weniger aktiven Strukturen δ -Valerolactam (3), Angelicalacton (4), Mevalonsäurelacton (5) und 2-H-Pyran-4-on (7) wurden nicht weiter getestet. 2-H-Pyran-2-on (6), das ebenfalls eine relativ niedrige Konzentration für 50% Keimungshemmung zeigte, wurde mit in die Versuche einbezogen, um den Vergleich zu den substituierten Verbindungen 8 und 9 herzustellen.

Tab.25: Konzentrationen für 50% α -Amylase-Hemmung (AH_{50}) an ganzen Karyopsen von *Avena sativa*. Vergleich der Parasorbinsäure und Strukturanalogen.

Nr Verbindung AH_{50} [Mol/l] $\times 10^{-3}$		
1	Parasorbinsäure	8,59 *
2	δ -Valerolacton	14,70 *
6	2-H-Pyran-2-on	21,96 *
8	Cumalinsäure	11,90 *
9	Cumalinsäuremethylester	52,90 *
10	Cumarin	1,56 *
11	Cumarin-3-carbonsäure	11,56 *
12	Cumarin-3-carbonsäure-methylester	7,29

* Die Werte für die Hemmung der α -Amylase wurden auf 50% extrapoliert

Tab. 25 zeigt den Vergleich der Konzentration für 50% Hemmung der α -Amylase-Aktivität an *Avena sativa*.

Aufgrund der Struktur sollte die Aktivität von 1 zwischen der von 2 und 6 liegen. Dies ist, wie auch schon bei der Bestimmung der Keimungshemmung an *Avena sativa*, nicht der Fall. Die Erhöhung der Hemmwirkung der α -Amylase läßt sich also nur durch die Substitution der Methylgruppe am Ring von 1 erklären.

Beim Vergleich von 6, 8 und 9 ergibt sich eine Erhöhung der Hemmaktivität durch die Substitution der Säurefunktion (6 und 8). Die Hemmwirkung der Verbindung 8 wird durch die Veresterung (9) sehr stark erniedrigt.

Betrachtet man die Verbindungen 10, 11 und 12, so läßt sich feststellen, daß der Einfluß der Säurefunktion bei 11 nicht so stark ist, wie beim Vergleich von 6, 8 und 9. Die Veresterung bei 12 ergibt eine leichte Erhöhung der Hemmaktivität. 10 zeigt die höchste Hemmwirkung der α -Amylase.

Für die graphische Darstellung der Ergebnisse im Vergleich zur Keimungs-

hemmung an *Avena sativa* wurde der $\text{Log } (1/\text{AH}_{50})$ berechnet und mit dem $\text{Log } (1/\text{KH}_{50})$ verglichen. Die höheren Säulen entsprechen dabei einer größeren Hemmaktivität.

Abb.51 zeigt den Vergleich (a) des $\text{Log } (1/\text{KH}_{50})$ mit (b) dem $\text{Log } (1/\text{AH}_{50})$ von Parasorbinsäure (1) mit Strukturanalogen. Alle Verbindungen erzeugen eine größere Aktivität bei Keimungshemmung an *Avena sativa* als bei der Hemmwirkung der α -Amylase. Die Verbindungen 1, 9 und 10 fallen durch eine besonders hohe Aktivitätsdifferenz auf.

Betrachtet man 1 im Vergleich zu 2 und 6, so scheint der Einfluß, durch Substitution der Methylgruppe, auf die Keimungshemmung stärker zu sein als auf die α -Amylase-Aktivität.

Bei 6 und 8 nehmen beide Aktivitäten durch die Substitution der Säurefunktion bei 8 zu. Während der Methylester 9 die gleiche Keimungshemmung wie 8 erzeugt, nimmt die Hemmwirkung der α -Amylase ab. Für die Keimungshemmung spielt die Substitution der Verbindung 6 zu 8 und 9 eine Rolle. Im Gegensatz dazu ist für die α -Amylase-Aktivität eher die Polarität der Verbindungen das wichtige Kriterium für die Hemmwirkung. Für die Verbindungen 8 und 9 läßt sich feststellen, daß die α -Amylase-Aktivität nicht die entscheidende physiologische Wirkung der Keimungshemmung sein kann.

Die Strukturen 11 und 12 zeigen bei der Keimungshemmung ein ähnliches Verhalten wie die Verbindungen 8 und 9. 12 sollte bei der Hemmung der α -Amylase wie 9 reagieren, dies ist jedoch nicht der Fall. Bei 12 können also zusätzliche Wirkungen auftreten, die die Hemmwirkung der α -Amylase verursachen oder durch 9 werden Reaktionsmechanismen der Hemmung der α -Amylase nicht in Gang gesetzt. 10 erzeugt im Verhältnis zur Keimungshemmung eine relativ geringe Hemmwirkung der α -Amylase. Im Vergleich der Differenzen von 6, 11 und 12 sollte die α -Amylase-Aktivität von 10 wesentlich höher sein.

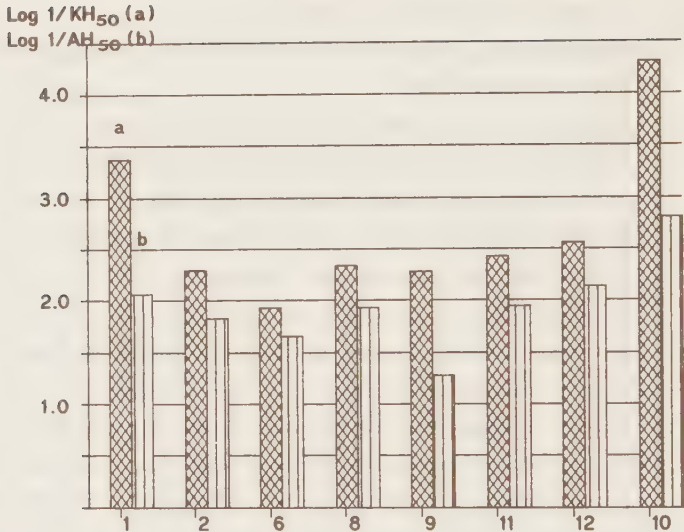


Abb.51 : Vergleich der Parasorbinsäure (1) mit δ -Valerolacton (2), 2-H-Pyran-4-on (6), Cumalinsäure (8), Cumalinsäuremethylester (9), Cumarin-3-carbonsäure (11), Cumarin-3-carbonsäuremethylester (12) und Cumarin (10). Dargestellt sind (a) der Log (1/KH₅₀) und (b) der Log (1/AH₅₀). KH₅₀ = Konzentration für 50% Keimungshemmung an *Avena sativa*; AH₅₀ = Konzentration für 50% Hemmung der α -Amylase-Aktivität an ganzen Karyopsen von *Avena sativa*.

3.1.2 Isopropyläpfelsäuredimethylester und Strukturanaloge

Die Strukturanalogen des Isopropyläpfelsäuredimethylesters wurden teilweise von Kohlmeyer (1987) untersucht. Alle in den Keimungshemmtest eingesetzten Verbindungen wurden ebenfalls auf die α -Amylase-Hemmung überprüft.

Tab. 26: Konzentration für 50% α -Amylase-Hemmung (AH_{50}) an ganzen Karyopsen von *Avena sativa*. Vergleich von Isopropyläpfelsäuredimethylester und Strukturanalogen.

Nr	Verbindung	AH_{50} [Mol/l] $\times 10^{-3}$
13	Isopropyläpfelsäuredimethylester	9,58 ⁺
14	Methyl-2,3-di(methoxycarbonyl)-nonanoat	19,33 ⁺
15	Methyl-2,3-di(methoxycarbonyl)-undecanoat	95,05 ⁺
16	Methyl-2-cyanononanoat	8,36 ⁺
(17	Methyl-2-cyanoundecanoat	0,38 [*])
18	Methyl-2-methoxycarbonylnonanoat	7,99 ⁺
(19	Methyl-2-methoxycarbonylundecanoat	1,27 [*])
20	2-Hydroxymethylnonanol	8,74 ⁺
(21	2-Hydroxymethylundecanol	1,34 [*])

* Berechnete Werte aus Verdünnungsreihen von Kohlmeyer (1987).

+ Die Werte für die Hemmung der α -Amylase wurden auf 50% extrapoliert

Tab. 26 zeigt den Vergleich der Konzentrationen für 50% α -Amylase-Hemmung des Isopropyläpfelsäuredimethylesters und der Strukturanalogen.

Der Glucoseblindwert war bei den Test von 17, 19 und 21 nur halb so groß wie bei den anderen Untersuchungen. Berechnet man die Konzentrationen mit einem Standard, der bei den anderen Versuchen erzielt wurde, ergeben sich für 17, 19 und 21 Konzentrationen, die etwas mehr als doppelt so hoch liegen. Die trotz allem bestehenden Differenzen lassen sich im Augenblick nicht erklären.

Die Strukturen 16, 18 und 20 ergeben eine Konzentration für 50% der α -Amylase-Hemmung in derselben Größenordnung. Der Einfluß der verschiedenen funktionellen Gruppen dieser Substanzen auf die α -Amylase-Aktivität

ist gering. Bei 14 ist die α -Amylase-Hemmung niedriger als bei 16, 18 und 20. 14 besitzt gegenüber 18 eine weitere Carboxymethylgruppe. Es könnten sterische Effekte bei 14 eine Erniedrigung der α -Amylase-Aktivität bewirken. Wie auch schon bei der Bestimmung der Keimungshemmung an *Avena sativa* zeigt 15 eine extrem niedrige Hemmung der α -Amylase-Aktivität.

Bei 13 ist die Hemmwirkung für 50% der α -Amylase etwas niedriger als bei den Verbindungen 16, 18 und 20. Dies könnte entweder auf den Einfluß den längeren Alkanketten bei 14, 16, 18 und 20 oder auf die zusätzliche Carbonsäuremethylesterfunktion bei 13 zurückzuführen sein.

Abb.52 zeigt den Vergleich des (a) $\text{Log}(1/\text{KH}_{50})$ mit dem (b) $\text{Log}(1/\text{AH}_{50})$ des Isopropyläpfelsäuredimethylesters (13) und einiger Strukturanalogen (14, 16, 18 und 20).

Bei den Verbindungen 16, 18 und 20 ergeben sich keine großen Unterschiede im Vergleich der Keimungshemmung mit der α -Amylase-Hemmung. Bei 14 ist die Keimungshemmung in der Größenordnung der Substanzen 16, 18 und 20, die α -Amylase-Hemmung jedoch niedriger. Bei 14 müssen also weitere physiologische Wirkungen vorhanden sein, die bei 16, 18 und 20 für die Keimungshemmung keine Rolle spielen.

13 zeigt gegenüber 16, 18 und 20 eine Erniedrigung der Keimungshemmung bei fast gleicher α -Amylase-Hemmung. Dies bedeutet, für die Keimungshemmung der Verbindungen 16, 18 und 20 kann nicht allein die α -Amylase-Hemmung verantwortlich sein.

Log $1/KH_{50}$ (a)

Log $1/AH_{50}$ (b)

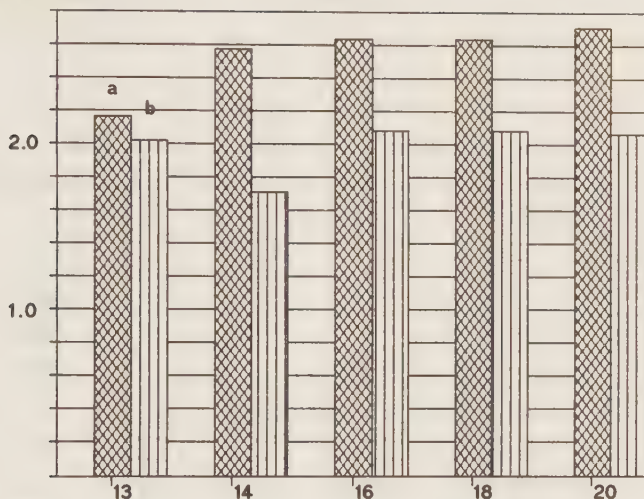


Abb.52: Vergleich des Isopropyläpfelsäuredimethylesters (13) mit Methyl-2,3-di(methoxycarbonyl)-nonanoat (14), Methyl-2-cyanononanoat (16), Methyl-2-methoxycarbonylnonanoat (18) und 2-Hydroxymethylnonanol (20). Dargestellt sind (a) der Log $1/KH_{50}$ und (b) der Log $1/AH_{50}$. Zu KH_{50} und AH_{50} siehe Abb.51.

3.1.3 Thujaketosäure und Strukturanaloga

Bis auf die Verbindung 26 wurden alle Strukturanalogen der Thujaketosäure auf die Hemmung der α -Amylase an ganzen Karyopsen untersucht.

Tab.27 zeigt den Vergleich der Konzentration für 50% α -Amylase-Hemmung an ganzen Karyopsen von Avena sativa der Thujaketosäure und ihrer Strukturanalogen.

Bei der Verbindung 23 ist gegenüber 22 die α -Amylase-Aktivität erhöht. Das gleiche Verhalten konnte auch bei den Strukturen 8 und 9 beobachtet

werden (siehe Tab.25).

22, 24, 25 und 26 unterscheiden sich kaum in ihrer Hemmwirkung auf die α -Amylase-Aktivität.

Tab.27. Konzentration für 50% α -Amylase-Hemmung (AH_{50}) an ganzen Karyopsen von *Avena sativa*. Vergleich von Thujaketosäure und Struktur-analogen.

Nr	Verbindung	AH_{50} [Mol/l] $\times 10^{-3}$
22	Thujaketosäure	18,57*
23	Thujaketosäuremethylester	24,08*
24	Z-Cyclopropan-1,2-dicarbonsäure- dimethylester	18,17*
25	E-Cyclopropan-1,2-dicarbonsäure- dimethylester	17,29*
27	3-Methylen-cyclopropan-1,2-dicar- bonsäuredimethylester	16,92*

* Die Werte für die Hemmung der α -Amylase wurden auf 50% extrapoliert

Abb.53 zeigt den Vergleich des $\log 1/KH_{50}$ mit dem $\log 1/AH_{50}$ der Thujaketosäure und ihrer Strukturanalogen.

Bei den Substanzen 22 und 23 beobachtet man bei der Keimungshemmung einen leichten Anstieg des Methylesters (23) und eine Abnahme der α -Amylase-Hemmung. Die Veresterung kann sich bei der Keimungshemmung nicht auf der Stufe der α -Amylase-Aktivierung auswirken.

Die Verbindungen 24, 25 und 27 zeigen bei der Keimungshemmung an *Avena sativa* eine Abnahme von 24 nach 27. Die α -Amylase-Hemmung nimmt von 24 nach 27 zu. Für 24 kann der für die Keimungshemmung wichtige Mechanismus nicht auf der Stufe der α -Amylase-Hemmung sein.

Log $1/KH_{50}$ (a)
Log $1/AH_{50}$ (b)

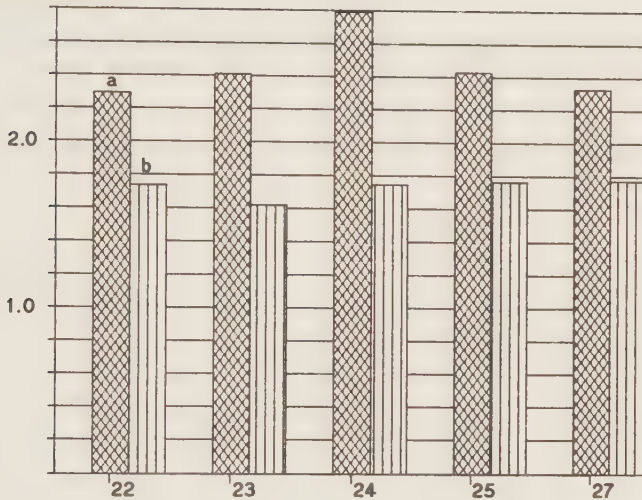


Abb.53: Vergleich der Thujaketosäure (22) mit Thujaketosäuremethylester (23), Z-Cyclopropan-1,2-dicarbonsäuredimethylester (24), E-Cyclopropan-1,2-dicarbonsäuredimethylester (25) und 3-Methylen-cyclopropan-1,2-dicarbonsäuredimethylester (27). Dargestellt sind (a) Log ($1/KH_{50}$) und (b) Log ($1/AH_{50}$). Zu KH_{50} und AH_{50} siehe Abb.51.

3.1.4 Monoterpene

Alle auf Keimungshemmung an *Avena sativa* untersuchten Monoterpene, wurden auf die Hemmung der α -Amylase an ganzen Karyopsen überprüft.

Tab.28 Konzentration für 50% α -Amylase-Hemmung (AH_{50}) an ganzen Karyopsen von *Avena sativa*. Vergleich der Monoterpene.

Nr	Verbindung	AH_{50} [Mol/l] $\times 10^{-3}$
28	Fenchon	39,42 *
29	Thujon (α und β)	—
30	Campher	12,70 *
31	Menthol	5,16 *
32	Thujylalkohol	—
33	Borneol	45,43 *
34	Isoborneol	22,83 *
35	Terpinen-4-ol	—
36	α -Terpineol	15,63 *
37	Thymol	5,75 *
38	Carvacrol	4,29 *
39	Geraniol	25,67 *
40	Citronellol	21,94 *

* Die Werte für die Hemmung der α -Amylase wurden auf 50% extrapoliert

Tab.28 zeigt den Vergleich der Konzentration für die α -Amylase-Hemmung (AH_{50}) an ganzen Karyopsen von *Avena sativa* der untersuchten Monoterpene.

29, 32 und 35 bewirken bei einer Konzentration von 10^{-2} Mol/l keine Hemmung der α -Amylase. Diese Verbindungen müssen bei der Keimungshemmung einen anderen Wirkungsmechanismus beeinträchtigen.

Vergleicht man die Verbindungen 33 und 34 wie auch 35 und 36, so zeigen die Strukturen, bei denen die Alkoholfunktion etwas stärker abgeschirmt ist, die höhere Hemmung der α -Amylase.

Die Monoterpenketone 28 und 30 unterscheiden sich in der Stellung zweier Methylgruppen am Ringsystem. Sind die Methylgruppen in Nachbarstellung zur Ketofunktion, so ergibt sich eine Erhöhung der α -Amylase-Aktivität.

Betrachtet man die Alkohole **31** und **37**, so führt die Aromatisierung bei **37** zu einer Erniedrigung der α -Amylase-Aktivität.

Die aromatischen Monoterpenalkohole **37** und **38** zeigen neben **31** die höchste Hemmung der α -Amylase aller untersuchten Monoterpene. Auch hier läßt sich feststellen, daß die etwas freier verfügbare Alkoholfunktion bei **37** eine Erhöhung der α -Amylase-Aktivität bewirkt.

Für den Vergleich mit der Keimungshemmung an *Avena sativa* wurde der $\text{Log } (1/\text{AH}_{50})$ berechnet.

$\text{Log } 1/\text{KH}_{50}(\text{a})$

$\text{Log } 1/\text{AH}_{50}(\text{b})$

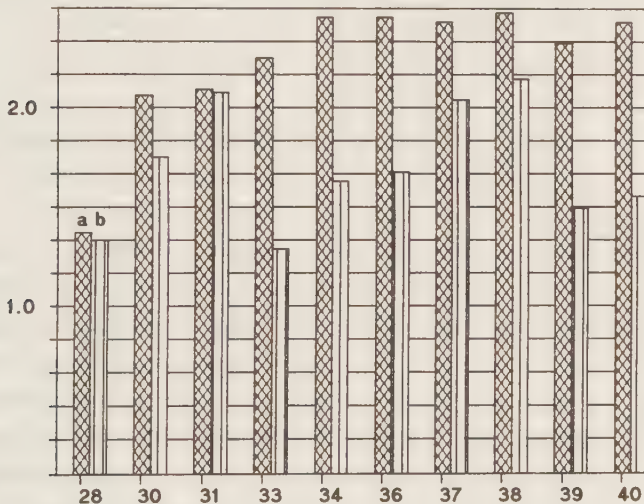


Abb.54: Vergleich der Monoterpene Fenchon (**28**), Campher (**30**), Menthol (**31**), Borneol (**33**), Isoborneol (**34**), α -Terpineol (**36**), Thymol (**37**), Carvacrol (**38**), Geraniol (**39**) und Citronellol (**40**). Dargestellt sind (a) $\text{Log } (1/\text{KH}_{50})$ und (b) $\text{Log } (1/\text{AH}_{50})$. Zu KH_{50} und AH_{50} siehe Abb.51

Abb.54 zeigt den Vergleich des $\text{Log } (1/\text{KH}_{50})$ mit dem $\text{Log } (1/\text{AH}_{50})$

der Monoterpene.

Die Monoterpenketone **28** und **30** zeigen eine niedrigere Keimungshemmung als die Alkohole. Im Verhältnis dazu ist die α -Amylase-Hemmung hoch. Die Differenzen zwischen Keimungshemmung und α -Amylase-Hemmung sind bei den cyclischen Alkoholen **33**, **34** und **36** und den offenkettigen Verbindungen **39** und **40** vergleichbar. Im Gegensatz dazu sind die Unterschiede der α -Amylase-Hemmung und der Keimungshemmung bei den aromatischen Alkoholen **37** und **38** nicht so groß. Dies bedeutet, daß die Strukturen **33**, **34**, **36**, **39** und **40** weitere Wirkungsmechanismen für die Keimungshemmung besitzen müssen, da sie eine Keimungshemmung in derselben Größenordnung wie **37** und **38** erzeugen. Menthol (**31**) bildet eine Ausnahme aller untersuchten Verbindungen, da hier Keimungshemmung und α -Amylase-Hemmung nahezu identisch sind.

3.2 Bestimmung der α -Amylase-Aktivität embryofreier Karyopsen von Avena sativa mit Gibberellinsäure- Zusatz

Um zu überprüfen, welche der getesteten Verbindungen einen Einfluß auf die Gibberellin-Biosynthese oder den Transport der Gibberelline ausüben, wurden einzelne repräsentative Substanzen ausgewählt und mit ihnen folgende Versuche durchgeführt. Hierzu wurden halbierte, embryofreie Karyopsen unter Zusatz von 10^{-6} Mol/l GA_3 -Lösung mit den Substanzen für 24 Stunden inkubiert (siehe III.C.4.2) und anschließend aufgearbeitet wie unter III.C.4.1 beschrieben. Zum Vergleich mit den unter IV.D.3.1 dargestellten Ergebnissen wurde aus den Verdünnungsreihen der Wert für 50% Hemmwirkung der α -Amylase $(\text{AH}+\text{GA})_{50}$ berechnet. Für Cumarin wurden zur Berechnung der 50% igen Hemmung die Konzentrationen von 10^{-3} und 10^{-4} Mol/l verwendet, um die Werte mit den Untersuchungen an ganzen Karyopsen vergleichen zu können.

Tab.29 zeigt den Vergleich der Konzentration für 50% Hemmung der α -Amylase $(\text{AH}+\text{GA})_{50}$ an halbierten embryofreien Karyopsen von Avena sativa. Getestet wurde ein Teil der zuvor unter IV.C.3.1 untersuchten Verbindungen.

Alle eingesetzten Substanzen bewirken eine Hemmung der α -Amylase-Aktivität. Für die graphische Darstellung wurde der $\text{Log } 1/(\text{AH}+\text{GA})_{50}$ berechnet und mit dem $\text{Log } 1/\text{AH}_{50}$ verglichen.

Tab.29: Konzentration für 50% Hemmung der α -Amylase [$(\text{AH}+\text{GA})_{50}$] halbierter embryofreier Karyopsen von *Avena sativa*. $(\text{AH}+\text{GA})_{50}$ ist die Konzentration für 50% der Hemmwirkung der α -Amylase an embryofreien Karyopsen unter GA_3 -Zusatz.

Nr	Verbindung	[$(\text{AH}+\text{GA})_{50}$] Mol/l x 10^{-3}
1	Parasorbinsäure	3,34
9	Cumalinsäuremethylester	6,61
10	Cumarin	1,00*
11	Cumarin - 3 - carbonsäure	7,81
12	Cumarin - 3 - carbonsäuremethylester	4,52
14	Methyl - 2,3 - di(methoxycarbonyl) - nonanoat	20,48*
16	Methyl - 2 - cyanononanoat	4,94
18	Methyl - 2 - methoxycarbonylnonanoat	1,58
22	Thujaketosäure	6,77
28	Fenchon	10,45*
30	Campher	7,36
31	Menthol	4,91
36	α - Terpineol	7,74
37	Thymol	4,09
38	Carvacrol	3,94
39	Geraniol	4,21
40	Citronellol	7,01

* Die Werte für die Hemmung der α -Amylase wurden auf 50% extrapoliert

Log $1/AH_{50}$ (a)

Log $1/(AH+GA)_{50}$ (b)

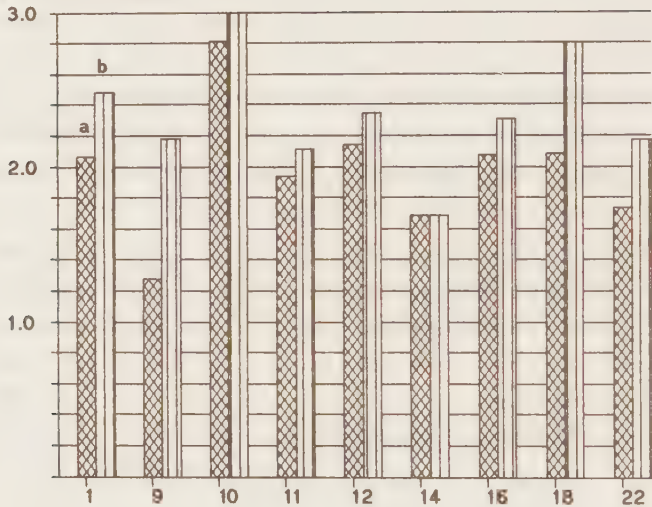


Abb.55 Vergleich des (a) Log $1/AH_{50}$ mit dem (b) Log $1/(AH+GA)_{50}$. Dargestellt sind die Verbindungen Parasorbinsäure (1), Cumalinsäuremethylester (10), Cumarin (10), Cumarin-3-carbonsäure (11), Cumarin-3-carbonsäuremethylester (12), Methyl-2,3-di(methoxycarbonyl)-nonanoat (14), Methyl-2-cyanononanoat (16), Methyl-2-methoxycarbonylnonanoat (18) und Thujaketosäure (22). AH_{50} entspricht der Konzentration für 50% Hemmung der α -Amylase an ganzen Karyopsen von *Avena sativa*; $(AH+GA)_{50}$ entspricht der Konzentration für 50% Hemmung der α -Amylase an embryofreien Kornhälften von *Avena sativa* unter Zusatz von GA_3 .

Abb. 55 und 56 zeigen den Log $1/AH_{50}$ im Vergleich zum Log $1/(AH+GA)_{50}$ aller Verbindungen, die an halbierten, embryofreien Karyopsen unter Zusatz von Gibberellinsäure (GA_3) untersucht wurden.

Bis auf eine Substanz erhöht sich bei allen die Hemmwirkung mehr oder weniger stark. Um die Differenz $[\text{Log } 1/(\text{AH}+\text{GA})_{50} - \text{Log } 1/\text{AH}_{50}]$ der einzelnen Verbindungen deutlicher hervorzuheben, wurden diese graphisch dargestellt (Abb.57).

$\text{Log } 1/\text{AH}_{50}$ (a)

$\text{Log } 1/(\text{AH}+\text{GA})_{50}$ (b)



Abb.56: Vergleich des (a) $\text{Log } 1/\text{AH}_{50}$ mit dem (b) $\text{Log } 1/(\text{AH}+\text{GA})_{50}$. Dargestellt sind die Monoterpene Fenchon (28), Campher (30), Menthol (31), α -Terpineol (36), Thymol (37), Carvacrol (38), Geraniol (39) und Citronellol (40). Zu AH_{50} und $(\text{AH}+\text{GA})_{50}$ siehe Abb.55.

$\Delta \text{Log } 1/(\text{AH}+\text{GA})_{50} - \text{Log } 1/\text{AH}_{50}$

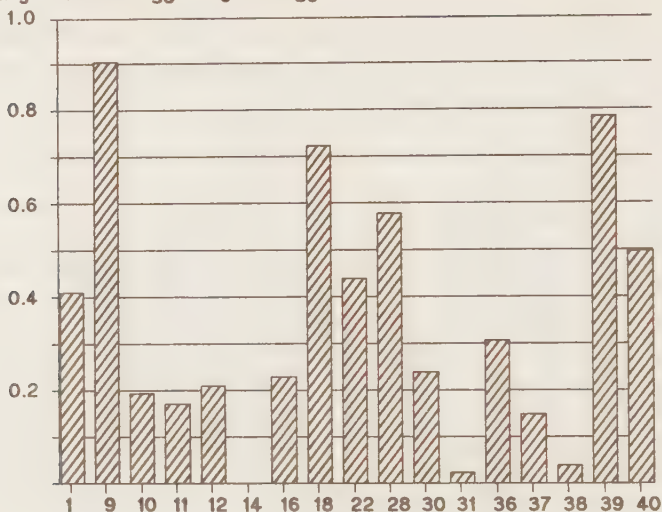


Abb.57: Differenz des $\text{Log } 1/(\text{AH}+\text{GA})_{50} - \text{Log } 1/\text{AH}_{50}$. Dargestellt sind Parasorbinsäure (1), Cumalinsäuremethylester (9), Cumarin (10), Cumarin-3-carbonsäure (11), Cumarin-3-carbonsäuremethylester (12), Methyl-2,3-di(methoxycarbonyl)-nonanoat (14), Methyl-2-cyanononanoat (16), Methyl-2-methoxycarbonylnonanoat (18), Thujaketosäure (22), Fenchon (28), Campher (30), Menthol (31), α -Terpineol (36), Thymol (37), Carvacrol (38), Geraniol (39) und Citronellol (40). Zu AH_{50} und $(\text{AH}+\text{GA})_{50}$ siehe Abb.55.

Die positiven Werte bedeuten, daß die Hemmung der α -Amylase durch Gabe von GA_3 nicht aufgehoben wird. Die Erhöhung der Hemmwirkung bei den meisten Substanzen könnte zwei Gründe haben:

1. Da mit Kornhälften von *Avena sativa* gearbeitet wurde, könnten bei diesen Versuchen die Wirksubstanzen möglicherweise besser aufgenommen werden. Dies wurde überprüft, indem halbierte embryohaltige Karyopsen von

Avena sativa unter Zusatz von Parasorbinsäure untersucht wurden. Dieser Versuch ergab dieselbe Hemmung der α -Amylase wie bei den unter IV.C.3.1.1 beschriebenen Ergebnissen. Es bedeutet, daß die Aufnahmebedingungen keine wesentliche Rolle für die Hemmwirkung der α -Amylase spielen.

2. Die Freisetzung der α -Amylase aus der Aleuronschicht wird durch GA_3 induziert. Daraus ergeben sich gegenüber den unter IV.C.3.1 beschriebenen Versuchen erhöhte Blindwerte. Bei gleicher Hemmwirkung in beiden Versuchen wird eine höhere prozentuale Hemmung durch den größeren Blindwert berechnet.

Für alle Verbindungen mit positiver oder mit der Differenz nahe Null läßt sich feststellen:

1. Die Gibberellin-Biosynthese wird von diesen Substanzen nicht beeinflusst.
2. Der Transport der Gibberelline wird ebenfalls nicht beeinträchtigt.
3. Diese Verbindungen verhindern die Bildung oder Freisetzung der α -Amylase. Des weiteren können sie möglicherweise die α -Amylase-Aktivität nach ihrer Freisetzung hemmen.

3.3 Exogener Test auf die Hemmung der α -Amylase-Aktivität

Einige der Verbindungen, die bei dem unter IV.C.3.2 beschriebenen Versuch eine positive Differenz zeigen, wurden auf ihre Hemmwirkung der α -Amylase im zellfreien System untersucht.

Die Ansätze erfolgten in Anlehnung an die Versuche von Murao et al (1981) und Kotaru et al (1987).

Da α -Amylase aus Getreidemaalz verwendet wurde, mußte diese zunächst auf ihre Wirksamkeit überprüft werden. Der Ansatz erfolgte wie unter III.D.4.3 beschrieben. Es wurden unterschiedliche Mengen an α -Amylase eingesetzt und die Extinktionsdifferenzen bei 660 nm gegenüber einem entsprechenden Blindwert bestimmt.

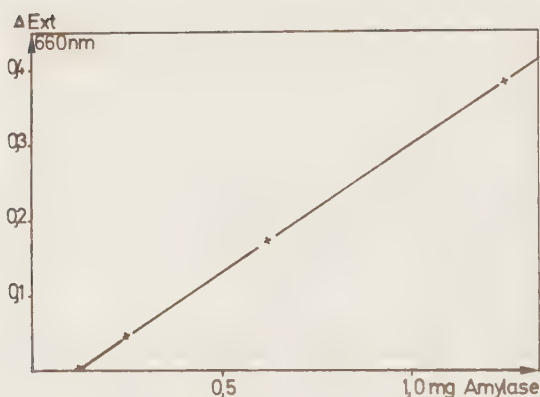


Abb.58 Abhängigkeit der Extinktionsdifferenz bei 660 nm von der Menge an eingesetzter α -Amylase.

Wie in Abb.58 dargestellt, ergibt sich eine lineare Abhängigkeit der Extinktionsdifferenz bei 660 nm von der Menge an eingesetzter α -Amylase. Die Verbindungen Parasorbinsäure (1), Cumarin-3-carbonsäuremethylester (12), Methyl-2-cyanononanoat (16), Methyl-2-methoxycarbonyl-nonanoat (18), Menthol (31), Thymol (37), Carvacrol (38) und Geraniol (39) wurden auf ihre Hemmung der α -Amylase untersucht.

Tab.30 zeigt die Extinktionsdifferenz bei 660 nm der Substanzen bei einer Konzentration im Ansatz von 10^{-2} Mol/l. Da sich bei keiner Probe eine nennenswerte Hemmwirkung ergibt, wurde keine prozentuale Hemmwirkung berechnet. Bei sechs Verbindungen (1, 12, 16, 31, 37, 39) ist die Aktivität der α -Amylase minimal erhöht. Es läßt sich daraus schließen, daß keine der Verbindungen auf die α -Amylase direkt einwirken kann. Sie müssen auf der Ebene der Bildung oder Freisetzung der α -Amylase aktiv sein.

Tab.30: Extinktionsdifferenz [Probe - Wasserwert ($\Delta \text{Ext}_{660\text{nm}}$)] bei 660 nm der untersuchten Verbindungen bei einer Konzentration von 10^{-2} Mol/l.

Nr	Verbindung	$\Delta \text{Ext}_{660\text{nm}}$
1	Parasorbinsäure	+ 0,027
12	Cumarin - 3 - carbonsäuremethylester	+ 0,031
16	Methyl - 2 - cyanononanoat	+ 0,041
18	Methyl - 2 - methoxycarbonyl - nonanoat	± 0
31	Menthol	+ 0,015
37	Thymol	+ 0,018
38	Carvacrol	- 0,017
39	Geraniol	+ 0,005

4. Diskussion der Ergebnisse

Geht man von dem gedanklichen Ansatz aus, daß ein Keimungshemmstoff in den Samen diffundiert und an einer ganz bestimmten Stelle eines Stoffwechselvorganges eine Hemmwirkung verursacht, so ist die Hemmwirkung von dem entsprechenden Stoffwechselweg abhängig. Wird ein allgemeiner physiologischer Vorgang (z.B. Atmung), der in allen Samen vorhanden ist, betroffen, sollte Keimungshemmung auch bei unterschiedlichen Samen auftreten. Diese Keimungshemmung kann bei verschiedenen Samen mehr oder weniger stark ausgeprägt sein. Für eine andere Substanz, die denselben Stoffwechselweg an derselben Stelle beeinflußt, würde sich bei gleichen Aufnahmebedingungen in die verschiedenen Samen, ein paralleles Verhalten der beiden Verbindungen ergeben.

Meist wirken Keimungshemmstoffe jedoch gleichzeitig auf verschiedene Stoffwechselvorgänge mehr oder weniger stark ein (Dörffling, 1985). Beim Vergleich zweier strukturell verwandter Verbindungen, könnten einzelne Hemmwirkungen aufgehoben werden oder neu hinzu kommen. Für unterschiedliche

Samen ergeben sich dann keine parallelen Kurven.

Für die unterschiedliche Metabolisierung und der damit verbundenen Änderung im physiologischen Verhalten zweier ähnlicher Strukturen würden sich ebenfalls keine parallele Wirkung an den verschiedenen Samen ergeben.

Geänderte Aufnahmebedingungen an einem Samen durch Variation von Strukturen sollten sich bei nicht zu starker Veränderung der Moleküle erkennen lassen, wenn man an mehreren Samen die Keimungshemmung bestimmt.

So läßt sich z.B. zeigen, daß der Samen von *Amaranthus caudatus*, der fast ausschließlich Fette enthält, bevorzugt lipophilere Verbindungen aufnimmt. Besonders stark kommt dies im Vergleich der Cumalinsäure (8) und des Cumalinsäuremethylesters (9) an den Samenmaterialien (siehe Abb.42) zum Ausdruck. Es läßt sich aber auch bei Abscisinsäure (41) und Abscisinsäuremethylester (42) nachweisen (siehe Abb.50).

Betrachtet man alle untersuchten Substanzen unter der oben aufgeführten Voraussetzung, so lassen sich die Verbindungen nach ihrem unterschiedlichen Verhalten an den drei Samenmaterialien einordnen.

Der größte Anteil der Strukturen zeigt an *Amaranthus caudatus* die höchste und an *Avena sativa* die niedrigste Keimungshemmung. Die Hemmwirkung an *Lepidium sativum* liegt in der Mitte.

Sehr einheitlich verhält sich die Substanzklasse der Monoterpene (siehe Abb.48 und 49). Umfangreichere Untersuchungen des Struktur-Wirkungs-Prinzips der Monoterpene an *Lactuca sativa* L. cv. Great Lakes wurden von Reynolds (1987) durchgeführt. Im Unterschied zu den in Tab.24 dargestellten Ergebnissen zeigen an *Lactuca sativa* L. die Monoterpenketone eine höhere Keimungshemmung als die Alkohole.

Die physiologischen Wirkungen der Monoterpene beruhen sehr wahrscheinlich in wesentlichen auf ihrer guten Lipidlöslichkeit. Monoterpenkohlenwasserstoffe bewirken antagonistische Effekte zum Ethylen (Sisler et al., 1985). Diese Wirkungsweise ist auch für die sauerstoffhaltigen Monoterpene denkbar. Da *Amaranthus caudatus* ethylenabhängig keimt (Kepczynski und Karssen, 1985), sollte eine derartige Aktivität der Monoterpene die Keimungshemmung be-

einflussen. Lorber und Muller (1976) konnten mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen nachweisen, daß 1,8-Cineol die Mitochondrien von Wurzelzellen sowie Membranen zerstört. An verschiedenen Bakterienstämmen konnte eine Hemmung des Elektronentransports der Atmung sowie eine Einwirkung auf die anschließende Oxidative Phosphorylierung bewiesen werden (Knobloch et al., 1986). Die wirksamsten Verbindungen sind bei diesen Versuchen Thymol und Carvacrol. Thymol und Carvacrol zeigen bei der Keimungshemmung keine besonders erhöhten Werte (siehe Tab.24). Es muß bei den Samenmaterialien also davon ausgegangen werden, daß neben einer möglichen Atmungshemmung weitere physiologische Funktionen gestört sind. Denkbar ist eine gleichzeitige Einwirkung der Monoterpene auf die unterschiedlichsten Membranen und einer daraus resultierenden Gesamtkeimungshemmung.

Eine weitere Gruppe, bei der die Keimungshemmung an den Samenmaterialien dieselbe Reihenfolge in der Stärke der Wirkung an den Samenmaterialien ergibt, sind die Strukturanalogen der Isopropyläpfelsäure. Diese Substanzen sind strukturell mit den Fettsäuren verwandt, weshalb sie in ihrer physiologischen Wirkung möglicherweise mit diesen vergleichbar sind. Für Fettsäuren wird eine Abhängigkeit der Keimungshemmung von der Kettenlänge nachgewiesen (Wanner et al., 1977). Bei der Pollenkeimung üben sie eine Hemmwirkung in Abhängigkeit des lipophilen Charakters der Verbindungen aus (Orito et al., 1986). Stewart und Berrie (1979) untersuchten die Keimungshemmung von Fettsäuren mit einer Kettenlänge von sechs C- bis neun C-Atomen in Abhängigkeit der Temperatur an *Lactuca sativa* Samen. Sie zeigten, daß die Hemmwirkung mit der Erhöhung der Temperatur zunimmt. Sie gehen davon aus, daß mit Erhöhung der Temperatur die Fettsäuren flüssiger werden und damit die Inkorporation in die Membranen zunimmt. Die untersuchten Strukturanalogen der Isopropyläpfelsäure sollten physiologisch ähnlich reagieren.

Die Aufnahme in die Samen von Verbindungen, die wie die Monoterpene oder die Strukturanalogen der Isopropyläpfelsäure reagieren, sollte bei fetthaltigen Samen besser sein als bei stärkehaltigen Samen. Dies würde zu einer er-

höhten keimungshemmenden Wirkung dieser Strukturen an fetthaltigen Samen führen. Die Ergebnisse (siehe Tab.22 und Tab.24) zeigen, daß an dem fetthaltigen Samen *Amaranthus caudatus* jeweils die höchste Keimungshemmung erzielt wird. Es bedeutet aber auch, daß bei allen diesen Strukturen keine spezifischen physiologischen Wirkungen vorliegen, sondern die verschiedensten Stoffwechselvorgänge gleichzeitig beeinflußt werden können. Für eine derartige Wirkung der Verbindungen sprechen zusätzlich die hohen molaren Konzentrationen, die zum Erzielen einer Keimungshemmung eingesetzt werden müssen. Im Vergleich zu Abscisinsäure (41) oder Cumarin (10) zeigt sich dies deutlich.

Für die Annahme, daß eine Veränderung der Membranen durch die untersuchten Verbindungen eintritt, sprechen auch die Ergebnisse der Versuche über die α -Amylase-Aktivität. Bei allen eingesetzten Strukturen dieser Substanzklassen konnte keine Hemmwirkung der Gibberellin-Biosynthese und des Transports der Gibberelline nachgewiesen werden. Von Buller et al. (1976) wurde die Hemmwirkung der α -Amylase an embryofreien Karyopsen der Gerste unter Zusatz von GA_3 und Fettsäuren mit einer Kettenlänge bis elf C-Atomen untersucht. Nonansäure, die eine entsprechende Kettenlänge zu den getesteten Strukturanalogen der Isopropyläpfelsäure hat, zeigt dabei die höchste Aktivität. Bei den untersuchten Monoterpenen und Strukturanalogen der Isopropyläpfelsäure wurde keine Hemmwirkung exogener α -Amylase erzielt. Es muß deshalb angenommen werden, daß diese Verbindungen die Bildung oder Freisetzung der α -Amylase verhindern. Dies könnte durch eine Änderung der Membranen bewirkt werden.

Wie weit die Thujaketosäure und ihre Strukturanalogen mit Ausnahme der Verbindung (27) in gleicher Weise reagieren wie die Monoterpene und Strukturanalogen der Isopropyläpfelsäure, läßt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht beurteilen.

Eine sehr heterogene Gruppe im Bezug auf die Keimungshemmung an den drei untersuchten Samenmaterialien stellen die Parasorbinsäure und Strukturanalogen dar.

Parasorbinsäure (1) zeigt an *Lepidium sativum* eine erniedrigte, an *Amaran-*

thus caudatus und *Avena sativa* eine Keimungshemmung in der gleichen Größenordnung (siehe Abb.41). Im Gegensatz zu den oben aufgeführten Verbindungen ist sie sehr gut wasserlöslich. Dies könnte erklären, daß die Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* nicht wesentlich höher als bei den anderen Samenmaterialien ist. Parasorbinsäure hemmt das Streckungswachstum der Zellen (Larsen, 1947). Auch die Keimungshemmung von Pollen ist beschrieben (Kuhn et al., 1943). Haynes und Jones (1946) testeten verschiedene cyclische, ungesättigte Lactone auf ihre Keimungshemmung an Kresse. Sie konnten zeigen, daß die δ -Lactone die größte Hemmwirkung erzeugen. Die Untersuchungen auf die Hemmung der α -Amylase ergeben einen Wirkungsmechanismus bei der Bildung oder Freisetzung der α -Amylase aus der Aleuronschicht.

Ein Teil der Verbindungen zeigt an *Lepidium sativum* keine Keimungshemmung (siehe Abb.41). Dieses Verhalten könnte auf schlechte Aufnahme der Substanzen zurückzuführen sein, oder sie zeigen in ihren physiologischen Wirkungen Unterschiede zu den anderen Verbindungen.

Die höchste Keimungshemmung aller untersuchten Keimungshemmstoffe und Strukturanalogen zeigt das Cumarin. Dies läßt auf spezifische physiologische Wirkungen schließen. Die physiologischen Wirkungen des Cumarins werden seit vielen Jahren untersucht (Mayer und Poljakoff-Mayber, 1961). So wurde u.a. von Khan und Tolbert (1966) an Salatsamen eine antagonistische Wirkung von Cumarin und Cycocel [(2-chloroethyl)trimethylammoniumchlorid] unter Einfluß von kürzerwelligem Rotlicht nachgewiesen. An *Avena Koleoptilen* zeigt sich eine reversible Reaktion bei Gabe von Indolessigsäure (Kuraishi und Muir, 1963). Des weiteren wurde eine reduzierte Permeabilität gegenüber Wasser nach Gabe von Cumarin gefunden (Guttenberg v. und Beythien, 1951). Auch als Atmungshemmstoff ist Cumarin beschrieben (Mayer et al, 1966) Die Untersuchungen der α -Amylase-Hemmung an ganzen Karyopsen und embrofreien Karyopsen unter Zusatz von GA_3 ergeben eine Aufhebung der Hemmwirkung bei den Versuchen an embrofreien Karyopsen (Khan, 1969). Dies entspricht nicht den erzielten Ergebnissen an *Avena sativa*. Khan geht jedoch davon aus, daß keine spezifische Hemm-

wirkung vorliegt, da keine vollständige Aufhebung der α -Amylase-Hemmung an embroyfreien Karyopsen unter GA_3 -Zusatz erreicht wird. Betrachtet man die Verbindungen Cumarin (10), Cumarin-3-carbonsäure (11) und Cumarin-3-carbonsäuremethylester (12) im Vergleich, ergibt sich keine Änderung bei der Hemmwirkung der α -Amylase (siehe Abb.57). Die Keimungshemmung an *Avena sativa* unterscheidet sich bei den drei Verbindungen jedoch sehr stark (siehe Abb. 42). Dies spricht für eine spezifische Reaktion des Cumarin an *Avena sativa*, die nicht auf der Ebene der GA_3 -Biosynthese wie auch der α -Amylase Bildung und Freisetzung stattfindet. Für den größten Teil der untersuchten Verbindungen scheint zum gegenwärtigen Zeitpunkt die Veränderung der Membranen eine wesentliche physiologische Wirkungsweise zu sein.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Isolierung und Strukturaufklärung der keimungshemmenden Verbindungen aus *Sorbus aucuparia* wurde an *Amaranthus caudatus* und *Lepidium sativum* durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß bei der Isolierung von Keimungshemmstoffen die Anwendung von zwei Samenmaterialien notwendig ist.
2. Es wurden drei Keimungshemmstoffe aus *Sorbus aucuparia* isoliert und deren Struktur aufgeklärt. Es sind dies Parasorbinsäure, Isopropyläpfelsäure und Abscisinsäure. Isopropyläpfelsäure war bisher noch nicht als Keimungshemmstoff beschrieben.
3. Parasorbinsäure wurde mittels HPLC quantitativ in Früchten und Samen bestimmt. In den Früchten sind 4 bis 7 mg/g Frischgewicht und im Samen 0,1 mg/g Samen enthalten. In den Samen sind 0,03% der gesamten Menge an Parasorbinsäure vorhanden. Die Konzentration für 50% Keimungshemmung beträgt an *Amaranthus caudatus* $3,9 \times 10^{-4}$ Mol/l, an *Lepidium sativum* $1,1 \times 10^{-3}$ Mol/l und an *Avena sativa* $4,3 \times 10^{-4}$ Mol/l.
4. Der Gehalt an Isopropyläpfelsäure wurde gaschromatographisch als Isopropyläpfelsäuredimethylester mit 1,0 bis 1,5 µg/g Frischgewicht in den Früchten bestimmt. Die Konzentration für 50% Hemmwirkung liegt in der Größenordnung an *Amaranthus caudatus* bei 3×10^{-4} Mol/l, an *Lepidium sativum* bei $2,3 \times 10^{-4}$ Mol/l und an *Avena sativa* bei $6,95 \times 10^{-3}$ Mol/l.
5. Abscisinsäure wurde gaschromatographisch als Abscisinsäuremethylester quantifiziert. Der Gehalt in den Früchten ergab 1,3 bis 2,5 µg/g Frischgewicht und in den Samen 0,27 µg/g Samen. Für Abscisinsäure wurde eine Konzentration für 50% Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* mit $6,2 \times 10^{-6}$ Mol/l, an *Lepidium sativum* mit $5,8 \times 10^{-7}$ Mol/l und an *Avena sativa* mit $6,2 \times 10^{-6}$ Mol/l bestimmt.
6. Die mögliche Wirkung der Keimungshemmstoffe in den Samen von *Sorbus aucuparia* wurde durch Vergleich des Gehaltes in den Samen und der

Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus*, *Lepidium sativum* und *Avena sativa* abgeschätzt. Für die Parasorbinsäure ergibt sich die größte Wirksamkeit an *Amaranthus caudatus*. Die eingesetzte Konzentration an Parasorbinsäure betrug $15,6 \times 10^{-9}$ Mol/Samen für 50% Keimungshemmung. Der quantitativ bestimmte Gehalt in den Samen von *Sorbus aucuparia* beträgt jedoch nur $4,5 \times 10^{-9}$ Mol/Samen. Bei Abscisinsäure wird die höchste Wirkung an *Lepidium sativum* erzielt. Für 50% Keimungshemmung an *Lepidium sativum* werden $2,3 \times 10^{-11}$ Mol/Samen benötigt. In den Samen von *Sorbus aucuparia* sind 5×10^{-12} Mol/Samen enthalten.

7. Die Aufnahme von Abscisinsäure in die Samen von *Amaranthus caudatus* wurde bestimmt. Es werden $5,1 \times 10^{-13}$ Mol/Samen aufgenommen. Bei dieser Konzentration im Samen von *Amaranthus caudatus* wird eine 100% ige Keimungshemmung erzielt. Der Gehalt in den Samen von *Sorbus aucuparia* ist damit um eine Zehnerpotenz höher als die für eine 100% ige Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* benötigte Menge.
8. In Weiterführung der Arbeit an *Thuja occidentalis* von Lohaus (1985), die ein Isomerenmisch isoliert hatte, wurde eine Isolierungsmethode bei Raumtemperatur unter Vermeidung von Isomerisierungsreaktionen ausgearbeitet.
9. Zwei Keimungshemmstoffe aus *Thuja occidentalis* konnten isoliert werden.
10. Einer dieser Keimungshemmstoffe wurde als Thujaketsäure identifiziert. Sie ist noch nicht als Keimungshemmstoff beschrieben. Die Konzentration für 50% Keimungshemmung beträgt an *Amaranthus caudatus* $5,5 \times 10^{-4}$ Mol/l, an *Lepidium sativum* $1,1 \times 10^{-3}$ Mol/l und an *Avena sativa* $5,2 \times 10^{-3}$ Mol/l. Sie ist ein Oxidationsprodukt des Thujons. Bei Thujaketsäure ist die Keimungshemmung im Vergleich zum Thujon an *Amaranthus caudatus* um das 1,2 fache und an *Avena sativa* um das 1,9 fache gesteigert. Für *Lepidium sativum* ergibt sich keine Steigerung in der Keimungshemmung.
11. Der zweite Keimungshemmstoff ist eine neutrale Verbindung, die strukturelle Ähnlichkeiten zur Abscisinsäure aufweist. Die 50% ige Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* ergibt sich bei einer Konzentration

von ca 6×10^{-5} Mol/l.

12. Die Wirkungsweise der Monoterpene Sabinen und Thujon, die in *Thuja occidentalis* enthalten sind, wurden untersucht. Sabinen lagert sich in Wasser zu Terpinen-4-ol um. Thujon kann zu Thujaketosäure oxidiert werden. In beiden Fällen wird durch die Umsetzung eine höhere Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* erzielt. Für die Bildung von Terpinen-4-ol aus Sabinen in Wasser wurde eine Reaktionsgeschwindigkeit von $1,01 \times 10^{-6}$ [Mol x l⁻¹ x h⁻¹] bestimmt. Durch Zusatz von Erde wird die Reaktion um das 1,7 fache gesteigert. Die Grenzkonzentration für die Löslichkeit von Terpinen-4-ol in Wasser liegt mit $7,2 \times 10^{-5}$ Mol/l um ca zwei Zehnerpotenzen niedriger als die für eine 50% ige Keimungshemmung an *Amaranthus caudatus* benötigte Konzentration (3×10^{-4} Mol/l). Die Reaktionsgeschwindigkeit der Bildung von Thujaketosäure ist mit $4,58 \times 10^{-9}$ [Mol x l⁻¹ x h⁻¹] wesentlich niedriger als die des Terpinen-4-ols. Weder für Thujon noch für Thujaketosäure wird im Wasser die für 50% Keimungshemmung erforderliche Konzentration erzielt (Menge an Thujon benötigt $6,46 \times 10^{-4}$ Mol/l; Grenzkonzentration im Wasser $1,48 \times 10^{-4}$ Mol/l erreicht; Menge an Thujaketosäure $5,5 \times 10^{-4}$ Mol/l benötigt; Grenzkonzentration im Wasser $1,1 \times 10^{-6}$ Mol/l erreicht).
13. Am Beispiel Thujon konnte gezeigt werden, daß die Aufnahme der Monoterpene in die Samen nicht von der Löslichkeit im Wasser abhängig ist, sondern daß die Konzentration in der Gasphase der entscheidende Faktor für die Keimungshemmung ist.
14. Es wurden Struktur-Wirkungsmechanismen von isolierten Keimungshemmstoffen und Strukturanalogen an den Samen von *Amaranthus caudatus*, *Lepidium sativum* und *Avena sativa* untersucht.
15. An *Amaranthus caudatus* ließ sich an mehreren Beispielen (u.a. Cumalinsäure und Cumalinsäuremethylester) zeigen, daß die Keimungshemmung mit Erhöhung des lipophilen Charakters der Verbindung zunimmt. Bei *Lepidium sativum* und *Avena sativa* spielt dieser Aspekt eine untergeordnete Rolle.

16. Die untersuchten Analogen des Isopropyläpfelsäuredimethylesters, der Thujaketosäure und die Monoterpene zeigen ein sehr ähnliches Verhalten an den drei Samenmaterialien. An *Amaranthus caudatus* wird die höchste, an *Avena sativa* die niedrigste Keimungshemmung erzielt. Für die Analogen der Isopropyläpfelsäure wie auch die Monoterpene ist ein wichtiges Kriterium für die Keimungshemmung die Veränderungen der Membranen. Wie weit dies wegen des gleichen Verhaltens an den Samenmaterialien auch für die Thujaketosäure und Analogen gilt, läßt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht entscheiden.
17. Die Parasorbinsäure und die untersuchten Analogen zeigen größere Unterschiede an den drei Samenmaterialien. Besonders auffällig ist die Aufhebung der Keimungshemmung an *Avena sativa* beim Vergleich von Cumarin und Cumarin-3-carbonsäure bzw. des Methylesters.
18. Die Hemmwirkung der α -Amylase in *Avena sativa*, als ein Beispiel für den Abbau eines Reservestoffes im Vergleich zur Keimungshemmung, wurde untersucht. Es konnte keine Korrelation zwischen der Hemmwirkung der α -Amylase und der Keimungshemmung nachgewiesen werden. Bei einigen Verbindungen, lassen sich mit Hilfe der Differenzen zwischen Keimungshemmung und Hemmung der α -Amylase-Aktivität weitere physiologische Wirkungen nachweisen.
19. Die Versuche mit embryofreien Karyopsen unter GA_3 -Zusatz zeigen, daß durch Gabe von GA_3 die Hemmung der α -Amylase nicht aufgehoben werden kann. Gleichzeitig konnte mit einem exogen Test auf die α -Amylase-Aktivität keine Hemmwirkung erzielt werden. Dies bedeutet, daß die untersuchten Verbindungen eine Wirkung bei der Bildung der α -Amylase auf einer GA_3 unabhängigen Stufe oder bei der Freisetzung der α -Amylase besitzen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- ASHFORD, A.E und GUBLER, F.: Mobilization of Polysaccharide Reserves from Endosperm in "Seed Physiology" (D.R. Murray, ed), Vol. 2, 117-162; Academic Press, London (1984)
- ASPLUND, R.O.: Monoterpenes: Relationship between structure and inhibition of germination
Phytochem. 7, 1995-1997 (1968)
- BANTHORPE, D.V., DAVIES, H.S., GATFORD, C., WILLIAMS, S.R.: Monoterpene patterns in Juniperus and Thuja species
Planta med. 23, 64-69 (1973)
- BAULCOMBE, D.C. und BUFFARD, D.: Gibberellinic-acid-regulated expression of α -amylase and six other genes in wheat aleurone layers
Planta 157, 493-501 (1983)
- BENZ, W.: Massenspektrometrie organischer Verbindungen
Methoden der Analyse in der Chemie Band 8, Akademische Verlagsgesellschaft Frankfurt am Main (1969)
- BHANDARI, M.C. und SEN, D.N.: Effect of Citrullus colocynthis (Linn.) Schrad. on the seedling growth of Pennisetum typhoideum Rich.
Z. Pflanzenphysiol. 64, 466-469 (1971)
- BITTNER, S., GORODETSKY, M. HAR-PAZ, I., MIZRAHI, Y. und RICHMOND, A.E.: Synthesis and biological effects of aromatic analogs of abscisic acid
Phytochem. 16, 1143-1151 (1977)
- BLACK, T.H.: The preparation and reactions of diazomethane
Aldrichimica Acta 16, 3-10 (1983)
- BODE, H.R.: Über die Blattausscheidungen des Wermuts und ihre Wirkung auf andere Pflanzen
Planta 30, 567-589 (1940)

- BOLTE, M.L., BOWERS, J., CROW, W.D., PATON, D.M., SAKURAI, A., TAKAHASHI, N., UJI-IE, M. und YOSHIDA, S.: Germination inhibitor from *Eucalyptus pulverulenta*
Agric. Biol. Chem. 48, 373-376 (1984)
- BOLTE, M.L., CROW, W.D., TAKAHASHI, N., SAKURAI, A., UJI-IE, M. und YOSHIDA, S.: Structure/activity relationships of grandinol an germination inhibitor in *Eucalyptus*
Agric. Biol. Chem. 49, 761-768 (1985)
- BROOK, A.J. und MUNDAY, K.C.: The interaction of phenols, anilins and benzoic acid with Sephadex gels
J. of Chromatogr. 47, 1 (1970)
- BUDZIKIEWICZ, H.: Massenspektrometrie
Taschentext 5, 2. Auflage, Verlag Chemie Weinheim (1980)
- BULLER, D.C., PARKER, W. und REID, J.S.G.: Short-chain fatty acids as inhibitors of gibberellin-induced amylosis in barley endosperm
Nature 260, 169-170 (1976)
- BUSTON, H.W. und ROY, S.K.: The physiological activity of some simple unsaturated lactons. II. Effect on certain tissues of higher plants
Arch. Biochem. 22, 269-274 (1949)
- CHABOT, J.F. und LEOPOLD, A.C.: Ultrastructural changes of membranes with hydration in Soybean seeds
Amer. J. Bot. 69, 623-633 (1982)
- CHARLWOOD, B.V. und BANTHORPE, D.V.: The biosynthesis of monoterpenes
Prog. in Phytochem Vol.5 (Reinhold, L.; Harborne, J.B.; Swain, T. ed) Pergamon Press 1978
- COOKE, R.S. und LYON, G.D.: Photodecarbonylation of (-)-Thujone and (+)-Isothujone
J. Am. Chem. Soc. 93, 3840-3841 (1971)
- DÄSSLER, H.G.: Über die keimungshemmende Wirkung von Bestandteilen des Kiefernterpenöls
Pharmazie 14, 46 (1959 a)

- DÄSSLER, H.G. : Über die keimungshemmende Wirkung von Bestandteilen des Tannenzapfenöls
Pharmazie 14, 111 (1959 b)
- DASGUPTA, J. und BEWLEY, J.D.: Desiccation of axes of *Phaseolus vulgaris* during development of a switch from a development pattern of protein synthesis to a germination pattern
Plant Physiol. 70, 1224-1227 (1982)
- DIEMAIR, W. und FRANZEN, K. : Über das Vorkommen der Parasorbinsäure und der Sorbinsäure
Z. f. Lebensm. Untersuch. Forsch. 109, 373-378 (1959)
- DÖRFFLING, K.: Das Hormonsystem der Pflanzen
Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 1982
- DÖRFFLING, K. : VI. Growth
Progr. in Bot. 47, 142-154 (1985)
- DRAFFAN, G.H., STILLWELL, R.N. und McCLOSKEY, J.A. : Electron impact-induced Rearrangement of trimethylsilyl groups in long chain compounds
Org. Mass Spec. 1, 669-685 (1968)
- DUBE, G. und KRIEGMANN, H.: Zum Verhalten von Trimethylalkoxysilanen bei Elektronenstoss
Org. Mass Spec. 1, 891-898 (1968)
- EASTMAN, R.H., STARR, J.E., MARTIN, R.S. und SAKATA, M.K.: The Photolysis of Thujone
J. Org. Chem. 28, 2162-2163 (1963)
- EEUWENS, C.J. und SCHWABE, W.W. : Seed and pod wall development in *Pisum sativum* L. in relation to extracted and applied hormones
J. Exp. Bot. 26, 1-14 (1975)
- EGLINGTON, G., HUNNEMAN, D.H. und McCORMICK, A. : Gas Chromatographic-Mass Spectrometric studies of long chain hydroxy acids
Org. Mass Spec. 1, 593-611 (1968)
- EINHELLIG, F.A., SCHON, M.K. und RASMUSSEN, J.A. : Synergistic effects of four cinnamic acid compounds on grain Sorghum
J. Plant Growth Regul. 1, 251-258 (1982)

- ESASHI, Y. und LEOPOLD, A.C.: Physical forces in dormancy and germination of
Xanthium seeds
Plant Physiol. 43, 871-876 (1968)
- FRIEDMAN, J.: Allelopathy in Desert Ecosystems Chapter 6
Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry; Amer. Chem. Soc. 1987
- FUKUI, H., KOSHIMIZU, K., USUDA, S. und YAMAZAKI, Y.: Isolation of Plant
Growth Regulators from Seeds of Cucurbita pepo L.
Agric. Biol. Chem. 41, 175-180 (1977 a)
- FUKUI, H., KOSHIMIZU, K., YAMAZAKI, Y. und USUDA, S.: Structures of Plant
Growth Inhibitors in Seeds of Cucurbita pepo L.
Agric. Biol. Chem. 41, 189-194 (1977 b)
- GRAY, R.T., DIEKMAN, J., LARSON, G.L., MUSKER, W.K. und DJERASSI, C.: Mass
Spectrometry in structural and stereochemical problems.— CLXXXIX. El
induced fragmentations and rearrangements of alkoxy-cyclohexanol trimethyl-
silyl ethers and alkoxy-cyclohexyl trimethylsilanes
Org. Mass Spec. 3, 973-991 (1970)
- GROß, D.: Wachstumsregulatorisch wirksame Pflanzeninhaltsstoffe
Zeitschr. f Chemie 20, 397-405 (1980)
- GUTTENBERG, H.von und BEYTHIEN, A.: Über den Einfluß von Wirkstoffen auf die
Wasserpermeabilität des Protoplasmas
Planta 40, 36-69 (1951)
- HARRIS, N. und CHRISPHEELS, M.J.: Histochemical and biochemical observations on
storage protein metabolism and protein body autolysis in cotyledons of ger-
minating Mung beans
Plant Physiol. 56, 292-299 (1975)
- HAYNES, L.J. und JONES, E.R.H.: Unsaturated Lactones. Part I. (Researches on
acetylenic compounds. Part X.) A new route to growth-inhibitory $\alpha\beta$ -ethyle-
nic γ - and δ -Lactones.
J. Chem. Soc. 1946, 954-957

- HEDDEN, P.: The use of combined Gas Chromatography-Mass Spectrometry in analysis of plant growth substances
Modern Methods of Plant Analysis Vol 3 (Linskens, H.F. und Jackson, J.F. ed)
Springer Verlag 1986
- HESSE, M., MEIER, H. und ZEEH, B.: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1979
- HIROTA, A., SAKAI, H. und ISOGAI, A.: New Plant growth regulators, Cladospolide A and B, Macrolides produced by *Cladosporium cladosporioides*
Agric. Biol. Chem. 49, 731-735 (1985)
- HOFMANN, A.W.: Neue flüchtige Säure der Vogelbeeren
Liebigs Ann.Chem. 110, 129-140 (1859)
- HOGETSU, T., SHIBAOKA, H. und SHIMOKORIYAMA, M.: Involvement of cellulose synthesis in action of gibberellin and kinetin on cell expansion. Gibberellin-coumarin and kinetin-coumarin interactions on stem elongation
Plant Cell Physiol. 15, 265-272 (1974)
- HSIAO, A.I., MCINTYRE, G.I. und HANES, J.A.: Seed dormancy in *Avena fatua* L. Induction of germination by mechanical injury
Bot. Gaz. 144, 217-222 (1983)
- HUANG, B-F., RODAWAY, S.J., WOOD, A. und MARCUS, A.: RNA synthesis in germinating embryonic axes of soybean and wheat
Plant Physiol. 65, 1155-1159 (1980)
- ISOGAI, A., WASHIZU, M., KONDO, K., MURAKOSHI, S. und SUZUKI, A.: Isolation and identification of (+)-Hexylitaconic acid as a plant growth regulator
Agric. Biol. Chem.: 48, 2607-2609 (1984)
- JUNITTILA, O.: Allelopathic inhibitors in seeds of *Heracleum laciniatum*
Physiol. Plant. 36, 374-378 (1976)
- KARL, R.: Untersuchungen an keimungshemmenden Extrakten aus Spelzen von *Avena sativa* L.
Dissertation, Universität München (1978)

- KEPCZYNSKI, J. und KARSEN, C.M.: Requirement for the action of endogenous ethylene during germination of non-dormant seeds of *Amaranthus caudatus*
Physiol. Plant. 63, 49-52 (1985)
- KETRING, D.L.: Germination inhibitors
Seed Sci. Technol. 1, 305-324 (1973)
- KHAN, A.A.: Cytokinin-Inhibitor antagonism in hormonal control of α -Amylase synthesis and growth in Barley seed
Physiol. Plant. 22, 94-103 (1969)
- KHAN, A.A. und TOLBERT, N.E.: Light-controlled Cycocel reversal of Lettuce seed germination and root growth
Physiol. Plant. 19, 76-80 (1966)
- KIENITZ, H.: Massenspektrometrie
Verlag Chemie (1968)
- KING, R.W.: Abscissic acid in developing Wheat grains and its relationship to grain growth and maturation
Planta 132, 43-51 (1976)
- KNOBLOCH, K., WEIGAND, H., WEIS, N., SCHWARM, H.-M., und VIGENSCHOW, H.: Action of terpenoids on energy metabolism
Progress in essential Oil Research, De Gruyter, Berlin New York (1986)
- KODOMA, H.: GC-MS Methods for Tobacco constituents
Modern Methods of Plant Analysis Vol 3 (Linskens, H.F. und Jackson, J.F. ed)
Springer Verlag 1986
- KOHLMEYER, A.C.: Synthese von Keimungsinhibitoren: Struktur-Wirkungsbeziehungen bei Tri- und Dicarbonsäurederivaten mit C₉ - und C₁₁ - Alkankette
Diplomarbeit, Universität München (1987)
- KOTARU, M., SAITO, K., YOSHIKAWA, H., IKEUCHI, T. und IBUKI, F.: Purification and some properties of an α -Amylase inhibitor from Cranberry bean (*Phaseolus vulgaris*)
Agric. Biol. Chem. 51, 577-578 (1987)

- KUHN, R. und JERCHEL, D.: Über Hexen-(2)-olid-(4.1) und Hexen-(2)-olid-(5.1); die Konstitution der Parasorbinsäure aus dem flüchtigen Öl der reifen Vogelbeeren
Ber. dtsh. chem. Ges. 76, 413-419 (1943)
- KUHN, R., JERCHEL, D., MOEWUS, F. und MÖLLER, E.-F.: Über die chemische Natur der Blastokoline und ihre Einwirkung auf keimende Samen, Hefen, Bakterien, Epithelgewebe und Fibroblasten
Naturwiss. 31, 468 (1943)
- KURASHI, S. und MUIR, R.M.: Mode of action of growth retarding chemicals
Plant Physiol. 38, 19-24 (1963)
- LARSEN, P.: Avena curvatures produced by mixtures of growth promoting and growth retarding substances
Amer. J. Bot. 34, 349-356 (1947)
- LARSEN, P.: Growth substances in higher plants
Modern methods of plant analysis, Springer Verlag, Vol. 3, 565-625 (1955)
- LOHAUS, E.: Isolierung und Strukturaufklärung von Keimungsinhibitoren aus den Spelzen von Avena sativa L. und Avena fatua L.
Dissertation, Universität München (1981)
- LOHAUS, E.: Keimungshemmstoffe aus Thuja occidentalis
Vortrag BMFT-Tagung Limburger Hof (1985)
Z. Naturforsch. 37c, 802-811 (1982)
- LOHAUS, E., BLOS, I. und RÜDIGER, W.: Carboxylic acids in Wheat, Rye and Barley
Z. Naturforsch. 38c, 524-530 (1983)
- LOHAUS, E., ZENGER, C. und RÜDIGER, W.: Natural inhibitors of germination and Growth III. New α -Pyrones from seeds of Rosa canina
Z. Naturforsch. 40c, 490-495 (1985)
- LOHAUS, E., BLOS, I., SCHÄFER, W. und RÜDIGER, W.: Natürliche Hemmstoffe von Keimung und Wachstum II. Isolierung und Struktur von Hemmstoffen aus Avena sativa L.
Z. Naturforsch. 37c, 802-811 (1982)
- LORBER, P. und MULLER, W.H.: Volatile growth inhibitors produced by Salvia leucophylla: Effects on seedling root tip ultrastructure
Amer. J. Bot. 63, 196-200 (1976)

- LOVEYS, B.R. und MILBORROW, B.V.: Isolation and characterization of 1'-O-Absciscic acid- β -D-glucopyranoside from vegetativ Tomato tissue
Aust. J. Plant Physiol. 8, 571-589 (1981)
- MAYER, A.M. und MARBACH, I.: Biochemistry of the transition from resting to germinating state in seeds
Prog. Phytochem. Vol.7, (Reinhold, L.; Harborne, J.B.; Swain, T. ed) Pergamon Press (1981)
- MAYER, A.M. und POLJAKOFF-MAYBER, A.: Coumarins and their role in growth and germination
4. Int. Conference on Plant Growth Regulation, Iowa State University Press (1961)
- MAYER, A.M. und SHAIN, Y.: Controll of seed germination
Ann. Rev. Plant Physiol. 25, 167-193 (1974)
- MAYER, A.M., POLJAKOFF-MAYBER, A. und KRISHMARO, N.: Properities and changes of glucose-6-phosphate dehydrogenase in germinating Lettuce seeds
Plant Cell Physiol. 7, 25-33 (1966)
- MILBORROW, B.V.: The chemistry and physiology of absciscic acid
Ann. Rev. Plant Physiol. 25, 259-307 (1974)
- MOEWUS, F. und SCHADER, E.: Die Wirkung von Cumarin und Parasorbinsäure auf das Austreiben der Kartoffelknollen
Z. Naturforsch. 66, 112-115 (1951)
- MOHR, H. und SCHOPFER, P.: Lehrbuch der Pflanzenphysiologie
3. Aufl., Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1978)
- MULLER, C. H., MULLER, W.H. und HAINES, B.L.: Volatile growth inhibitors produced by aromatic shrubs
Science 143, 471-473 (1964)
- MURAO, S., GOTO, A., MATSUI, Y., OHYAMA, K. und ARAI, M.: Isolation and identification of a hog pancreatic α -Amylase inhibitor (haim) producing Streptomyces
Agric. Biol. Chem. 45, 2599-2604 (1981)

- MUTHUKRISHNAN, S., CHANDRA, G.R. und MAXWELL, E.S.: Hormonal control of α -Amylase gene expression in Barley
J. Biol. Chem. 258, 2370-2375 (1983)
- NAKATANI, M., FUKUNAGA, Y. und HASE, T.: Aliphatic compounds from *Hybiscus rosa-sinensis*
Phytochem. 25, 449-452 (1986)
- NAMVAR, K. und SPETHMANN, W.: Die Baumarten der Gattung *Sorbus*: Vogelbeere, Mehlbeere, Elsbeere und Speierling
AFZ 36, 937-943 (1985)
- ORITO, K., SEKI, Y., WATANABE, A., MATSUMOTO, M. und IWADARE, T.: Relationship between inhibitory activity of myrmicacin analoges on *Camellia Japonica* pollen germination and their lipophility
Phytochem. 25, 941-943 (1986)
- PARRISH, D.J. und LEOPOLD, A.C.: Transient changes during Soybean imbibition
Plant Physiol. 59, 1111-1115 (1977)
- POOLE, C.F. und SCHUETTE, S.A.: Contemporary practice of chromatography
Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo, 1984
- REYNOLDS, T.: Comparative effects of aliphatic compounds on inhibition of Lettuce fruit germination
Ann. Bot. 41, 637-648 (1977)
- REYNOLDS, T.: Comparative effects of aromatic compounds on inhibition of Lettuce fruit germination
Ann. Bot. 42, 419-427 (1978)
- REYNOLDS, T.: Comparative effects of alicyclic compounds and Quinones on inhibition of Lettuce fruit germination
Ann. Bot. 60, 215-223 (1987)
- RICE, E.L.: Allelopathy
2. Aufl. Academic Press Inc. (1984)
- RICE, E.L.: Allelopathy: An overview. Chapter 2
Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry; Amer. Chem. Soc. (1987)
- RICHTER, G.: Stoffwechselphysiologie der Pflanzen
Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 4. Auflage, 1984

- RIZVI, S.J.H. und RIZVI, V.: Improving crop productivity in India: Role of allelochemicals. Chapter 7
Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry; Amer. Chem. Soc. (1987)
- ROSS, J.D.: Metabolic aspects of dormancy
in "Seed Physiology" (D.R. Murray, ed), Vol. 2, 45-75; Academic Press, London (1984)
- RYHAGE, R. und SYDOW, E. von: I. Monoterpene hydrocarbons
Acta Chem. Scand. 17, 2025-2035 (1963)
- SANDBERG, G., DUNBERG, A. und ODEN, P.-C.: Chromatography of acid phytohormones on columns of Sephadex LH 20 and insoluble poly-N-vinylpyrrolidone, and application to the analysis of conifer extracts
Plant Physiol. 53, 219-224 (1981)
- SEIBL, J.: Massenspektroskopie
Akademische Verlagsgesellschaft Frankfurt a.M. (1974)
- SHIMOMURA, H., SASHIDA, Y., NAKATA, H., YAMAMOTO, A., KAWAKUBO, Y. und KAWASAKI, J.: Germination and growth inhibitors in fruits of *Gardenia jasminoides*
Plant Cell Physiol. 24, 123-126 (1983)
- SHUTOV, A.D. und VAINTRAUB, I.A.: Degradation of storage proteins in germinating seeds
Phytochem. 26, 1557-1566 (1987)
- SIMON, E.W.: Early events in germination
in "Seed Physiology" (D.R. Murray, ed), Vol. 2, 77-115; Academic Press, London (1984)
- SISLER, E.C., GOREN, R. und HUBERMAN, M.: Effect of 2,5-norbornadiene on abscission and ethylene production in citrus leaf explants
Physiol. Plant. 63, 114-120 (1985)
- SPENCER, G.F., ENGLAND, R.E. und WOLF, R.B.: (-)-Cryptocaryalactone and (-)-deacetylcryptocaryalactone - germination inhibitors from *Cryptocarya moschata* seeds
Phytochem. 23, 2499-2500 (1984)

- SPITELLER, M. und SPITELLER, G. : Über das Auftreten α -Alkyl-substituierter Äpfelsäuren und β -Hydroxy- β -alkyl-substituierter Dicarbon- und Tricarbon-säurederivate als normale Stoffwechselprodukte.
J. Chromatogr. 164, 319-329 (1979)
- SPRAUL, M.: Monoterpene aus Thuja als Keimungshemmstoffe
Diplomarbeit, Universität München (1987)
- STEWART, R.R.C. und BERRIE, A.M.M.: Effect of temperature on the short chain fatty acid-induced inhibition of Lettuce seed germination
Plant Physiol. 63; 61-62 (1979)
- STRASBURGER, E.: Lehrbuch der Botanik
Gustav Fischer Verlag Stuttgart New York (1983)
- SVENDSEN, J.S., SYDNES, L.K. und WHIST, J.E.: A mass spectrometric study of dimethyl ester trimethylsilyl ether derivatives of some 3-Hydroxydicarboxylic acids
Org. Mass Spec. 22, 421-429 (1987)
- SVENSSON, S.-B.: A comparative study of the changes in root growth, induced by coumarin, auxin, ethylene, kinetin and gibberellic acid
Physiol. Plant. 26, 115-135 (1972)
- SYDOW, E. von: Mass spectrometry of terpenes. II. Monoterpene alcohols
Acta Chem. Scand. 17, 2504-2512 (1963)
- SYDOW, E. von: Mass spectrometry of terpenes. III. Monoterpene aldehydes and ketones
Acta Chem. Scand. 18, 1099-1104 (1964)
- TAYLORSON, R.B. und HENDRICKS, S.B.: Dormancy in seeds
Ann. Rev. Plant Physiol. 28, 331-354 (1977)
- TIETZ, A. und KASPRIK, W.: Identification of abscisic acid in a green alga
Biochem. Physiol. Pflanzen 181, 269-274 (1986)
- TRAN, V.N. und CAVANAGH, A.K.: Structural aspects of dormancy
in "Seed Physiology" (D.R. Murray, ed), Vol. 2, 1-44; Academic Press, London (1984)

- TRAUD, J. und MUSCHE, H. : Bestimmung und Identifizierung von α - und β -Thujon in Pflanzen mittels Capillar-Gas-Chromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS)
Fresenius Z. Anal. Chem. 315, 221-226 (1983)
- TSCHECHE, R., HOPPE, H.-J., SNATZKE, G., WULFF, G. und FEHLHABER, H.-W. :
Über Parasorbosid, den glykosidischen Vorläufer der Parasorbinsäure aus Vogelbeeren
Chem. Ber. 104, 1420-1428 (1971)
- TSUZUKI, E., YAMAMOTO, Y. UND SHIMIZU, T. : Fatty acids in Buckwheat are growth inhibitors
Ann. Bot. 60, 69-70 (1987)
- TYLER, J.M. : The seed mucilage of *Lepidium sativum* (Cress). Part I. Identification of the components and some neutral oligosaccharides derived from mucilage, together with the examination of a pentosan fraction
J. Chem. Soc. (London), 5288-5300 (1965 a)
- TYLER, J.M. : The seed mucilage of *Lepidium sativum* (Cress). Part II. Products of hydrolysis of the methylated mucilage and the methylated degraded mucilage
J. Chem. Soc. (London), 5300-5310 (1965 b)
- VILLIERS, T.A. und WAREING, P.F. : Dormancy in fruits of *Fraxinus excelsior* L.
J. Exp. Bot. 15, 359-367 (1964)
- WAGGONER, P.E. und PARLANGE J.-Y. : Water uptake and water diffusivity of seeds
Plant Physiol. 57, 153-156 (1976)
- WALLACH, O. : Ueber die Bestandtheile des Thujaöls
Liebigs Ann. Chem. 263, 99-125 (1892)
- WANNER, H., SANTOSA und STOCKER, H. : Different effects of long chain fatty acids on seed germination
Biochem. Physiol. Pflanzen 171, 391-399 (1977)
- WEBB, D.P. und WAREING, P.F. : Seed dormancy in acer: Endogenous germination inhibitors and dormancy in *Acer pseudoplatanus* L.
Planta 104, 115-125 (1972)

- WEPPLO, P.: Isolation and identification of plant growth inhibitors from leaves of American Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*). Chapter 30
Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry; Amer. Chem. Soc. (1987)
- WHITTAKER, D. und BANTHORPE, D.V.: The chemistry of thujane derivatives
Chem. Rev. 72, 305-312 (1972)
- WILLHALM, B., THOMAS, A.F., STOLL, M.: Mass spectra and organic analysis IV.
Some comments on the mass spectra of monoterpene alcohols
Acta Chem. Scand. 18, 1573-1576 (1964)
- WILLIAMS, D.H. und FLEMING, I.: Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1979)
- WILLIAMS, P.M., ROSS, J.D. und BRADBEER, J.W.: Studies in seed dormancy VII.
The Absciscic acid content of the seeds and fruits of *Corylus avellana* L.
Planta 110, 303-310 (1973)
- WOODGATE, P.D., GRAY, R.T. und DJERASSI, C.: Mass spectrometry in structural and stereochemical problems-CXCVII. Electron-impact induced functional group interaction in 4-benzylcyclohexyl trimethylsilyl ether
Org. Mass Spec. 4, 257-271 (1970)
- WUNDERLICH, F., KREUTZ, W., MAHLER, P., RONAI, A. und HEPPELER, G.: Thermotropic fluid-ordered "Discontinuous" phase separation in microsomal lipids of *Tetrahymena*. An X-ray diffraction study
Biochem. 17, 2005-2010 (1978)
- YAMASHITA, M.: Synthesis of certain hydroxycarboxylic acids related to isocitric acid
J. Org. Chem. 23, 835-837 (1958)
- YONEYAMA, K., KONNAI, M., TAKEMATSU, T., YOSHIDA, S., TAKAHASHI, N. und CROW, W.D.: Germination inhibitory activity of grandinol analogues
Agric. Biol. Chem. 51, 2607-2608 (1987)

ANMERKUNG ZU DIESER ARBEIT IN ZAHLEN UND WORTEN

Von 41150 Samen wurde die Wurzellänge bestimmt .

In Metern ausgedrückt wurden 823 m Wurzeln ausgemessen (durchschnittliche Wurzellänge von 20 mm) .

29350 Hafer - Samen mußten entspeltzt werden . Wer je einen Hafer - Samen eigenhändig entspeltzt hat , weiß , was das bedeutet .

Diese Arbeit beinhaltet 756000 Minuten meines Lebens .

"Es ist gleich , ob einer mit seinem Preßlufthammer oder an seiner Schreibmaschine verzweifelt . Nur die Theorien verstümmeln , was doch so klar ist , die Philosophien und die Wissenschaften insgesamt , die sich der Klarheit in den Weg stellen mit ihren unbrauchbaren Erkenntnissen . Es ist beinahe alles durchlaufen , was jetzt noch kommt , überrascht nicht , weil alle Möglichkeiten bedacht sind . Der soviel falsch gemacht hat und irritiert hat und gestört und zerstört hat und vernichtet hat und sich abgequält hat und studiert hat und sich oft erledigt hat und halb umgebracht hat und geirrt hat und geniert und wieder nicht geniert hat , wird in Zukunft irren und vieles falsch machen und wird irritieren und stören und zerstören und vernichten und sich abquälen und studieren und sich erledigen und halb umbringen und alles fortsetzen , bis zum Ende "

Thomas Bernhard

Lebenslauf

21.07.48	geboren in Waldkappel als Tochter des Apothekers Josef Oster und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Wepler
1955 - 1959	Volksschule in Waldkappel
1959 - 1965	Realschule in Eschwege (Mittlere Reife)
1965 - 1966	Frauenfachschule in Kassel
1966 - 1967	Praktikum im Staatlich Chemischen Untersuchungsamt in Kassel
1967 - 1969	Chemieschule in Bückeburg (Abschluß als Chemotechnikerin)
1969 - 1970	Max - Planck - Institut für Biologie Abt. Melchers in Tübingen
1971 - 1972	Stada - Arzneimittel AG in Dortelweil
1973 - 1976	Max - Planck - Institut für Biochemie Abt. Zillig in München
1977	Hochschulreife
1977 - 1984	Studium der Chemie an der Ludwig - Maximilian - Universität in München
Sept. 1984	Beginn der Dissertation am Botanischen Institut der Universität München unter Leitung von Prof. Dr. W. Rüdiger

